

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie

Studijní program: Fyziologie živočichů



Mgr. Simona Moravcová

Modulace signální dráhy JAK/STAT v suprachiasmatickém jádře hypotalamu potkana

Modulation of the JAK/STAT signaling pathway in the suprachiasmatic nucleus of rat
hypothalamus

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Konzultantka: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně na základě konzultací se svým školitelem doc. RNDr. Jiřím Novotným, DSc., vedoucím Skupiny membránových receptorů a buněčné signalizace, Katedry fyziologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a konzultantkou doc. RNDr. Zdeňkou Bendovou, Ph.D., vedoucí Skupiny fyziologických adaptací a biorytmů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 24. 06. 2021

.....

Mgr. Simona Moravcová

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho vstřícnost a dlouholeté odborné vedení po celou dobu mého vysokoškolského studia. Velké poděkování dále patří mé konzultantce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, možnost podílet se na zkoumání zajímavých vědeckých témat a předání znalostí a praktických laboratorních dovedností. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu z obou přilehlých laboratoří za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Velice děkuji také celé mé rodině za podporu během mého studia, a především mému příteli za pochopení, povzbuzování, důvěru a nekonečnou trpělivost při sepisování této práce.

Tato práce byla podpořena studentským projektem financovaným Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 361115), státními projekty financovanými Grantovou agenturou České republiky (projekty č. P303/12/1137 a 18-08423S) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekt č. SVV-260208/2015 a institucionální podpora č. LO1611 spadající pod Národní program udržitelnosti I).

Abstrakt

Cirkadiánní hodiny v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN) regulují denní rytmy v chování a fyziologii a jsou důležitou součástí mechanismů regulujících homeostázu savců. SCN jsou synchronizovány s 24hodinovým cyklem především působením světla, ale mohou být regulovány také různorodými nesvětelnými signály, jako jsou růstové faktory, opioidy, cytokiny, nebo lipopolysacharid (LPS), které působí prostřednictvím aktivace signální dráhy JAK/STAT. Proteiny rodiny STAT (z angl. signal transducers and activator of transcription) regulují mnoho aspektů buněčné fyziologie od růstu a diferenciaci až po imunitní odpověď. Signální dráha JAK/STAT však dosud nebyla v SCN zkoumána a funkce proteinů STAT v SCN není dosud objasněna.

V první části práce jsme se zaměřili na lokalizaci proteinů STAT3 a STAT5 v SCN potkana a stanovení denního rytmu na úrovni proteinů i mRNA. Výsledky našich experimentů ukázaly denní rytmus v hladinách proteinu STAT3 v astrocytech SCN potkana s nízkou, ale signifikantní amplitudou a maximem v ranních hodinách. Dále byla objevena silná, avšak ne rytmická, exprese proteinu STAT5A v astrocytech a proteinu STAT5B v neastrocytických buňkách SCN. Také bylo zjištěno, že *Stat3* mRNA vykazuje podobně jako protein cirkadiánní rytmus v SCN potkana s vysokou úrovní exprese během dne a nízkou v průběhu noci, a tudíž je rytmická exprese transkripčního faktoru STAT3 řízena cirkadiánními hodinami.

V druhé části práce jsme zkoumali účinek LPS (1 mg/kg) aplikovaného ve dne nebo v průběhu noci na behaviorální změny, a to sledováním rytmu v lokomoční aktivitě u potkanů. Z tohoto pozorování vyplývá, že obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě bylo pomalejší u zvířat, kterým byl systémově aplikovaný LPS během noci. Dále jsme se zabývali studiem okamžitých změn v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* a v hladinách fosforylovaných kináz ERK1/2 a GSK3 β v SCN v odpovědi na denní nebo noční stimulaci LPS. Tyto faktory jsou citlivé k vnějším signálům a fungují jako molekulární vstup do cirkadiánního mechanismu. Na tkáňových řezech SCN byly odhaleny mírné a přechodné změny v expresi vybraných hodinových genů a hladinách kináz po aplikaci LPS v porovnání s kontrolami. Dále jsme zjišťovali, zda systémově podaný LPS má vliv na úroveň exprese *Stat3* mRNA. Ukázalo se, že aplikace LPS vyvolá také změny v expresi *Stat3* mRNA v SCN v závislosti na době aplikace. Dále jsme se zaměřili na zkoumání účinku LPS na aktivaci proteinu STAT3. Akutní podání LPS ve dne nebo v noci indukovalo fosforylaci STAT3 na tyrosinu (Y705; pSTAT3(Y)) zatímco

fosforylace STAT3 na serinu (S727; pSTAT3(S)) byla indukována pouze při denní aplikaci LPS. Fosforylace STAT3 na tyrosinu (Y705) přetrvávala zvýšená i po 24 hodinách od denní aplikace LPS, ale snížila se během 8 hodin od aplikace LPS v noci. Výsledky těchto experimentů tedy ukázaly, že systémová zánětlivá stimulace endotoxinem LPS indukuje fosforylaci proteinu STAT3 v SCN závislou na denní době.

V souhrnu naše data poukazují na úlohu STAT3 v odpovědi cirkadiálních hodin na zánětlivou reakci vyvolanou aplikací LPS a poskytují tak další důkazy vzájemné interakce cirkadiálního systému s imunitním systémem. Dále také potvrzují, že citlivost organismu k zánětlivým stimulům je závislá na denní době.

Klíčová slova: cirkadiální rytmus, lipopolysacharid, proteiny STAT, suprachiasmatická jádra

Abstract

Circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN) regulates daily rhythms in behavior and physiology and is an important part of the mechanisms regulating mammalian homeostasis. SCN are synchronized with a 24-hour cycle mainly by light, but they can also be regulated by a variety of nonphotic signals, such as growth factors, opioids, cytokines, or lipopolysaccharide (LPS), which act by inducing the JAK/STAT signaling pathway. STAT family proteins (i.e. signal transducers and activator of transcription) regulate many aspects of cellular physiology, from growth and differentiation to immune response. However, the JAK/STAT signaling pathway has not yet been studied in the SCN and the function of STAT proteins in the SCN has not yet been clarified.

In the first part of the thesis, we focused on localization of STAT3 and STAT5 proteins in the rat SCN and determination of rhythm in proteins and mRNA. Our experiments showed the daily rhythm in the levels of STAT3 protein in SCN astrocytes of rat with low but significant amplitude and with maximum in the morning. In addition, we revealed strong but nonrhythmic expression of STAT5A protein in astrocytes and STAT5B protein in nonastrocytic cells of SCN. It was also found that *Stat3* mRNA show, similarly to protein, circadian rhythm in SCN of rats with high levels during the day and low levels during the night, and therefore rhythmic expression of transcription factor STAT3 is controlled by circadian clocks.

In the second part of this thesis, we examined the effect of LPS (1 mg/kg) applied during the day or night on behavioral changes by monitoring the rhythm of locomotor activity in rats. The research shows that the recovery of locomotor activity rhythm took longer in animals that were injected with LPS during the night. We also studied immediate changes in the expression of the clock genes *Per1*, *Per2* and *Rev-erba* and in the levels of phosphorylated kinase ERK1/2 and GSK3 β in SCN in response to day or night stimulation with LPS. These factors are sensitive to external cues and function as the molecular entry into the circadian clockwork. Slight and transient changes were detected in the expression of selected clock genes and in the levels of kinases in tissue slices after LPS application compared to controls. We also looked at whether systemic application of LPS affects expression of *Stat3* mRNA. It was shown that LPS also triggers changes in the expression of *Stat3* in SCN depending on the time of its administration. We also focused on investigating the effect of LPS on activation of STAT3 protein. Acute administration of LPS during the day or night induced STAT3 phosphorylation on

tyrosine (Y705; pSTAT3(Y)) while STAT3 phosphorylation on serine (S727; pSTAT3(S)) was induced only with daily LPS administration. STAT3 phosphorylation on tyrosine (Y705) persisted elevated even after 24 hours of daily LPS administration, but decreased within 8 hours after LPS administration at night. Thus, the results of these experiments showed that systemic inflammatory stimulation with endotoxin LPS induces phosphorylation of STAT3 protein in SCN depending on the time of day.

In summary, our data point to the role of STAT3 in the circadian clock response to inflammatory reaction caused by LPS, providing further evidence of the interaction of the circadian system with the immune system. These results also confirm that the sensitivity of the organism to inflammatory stimuli depends on the time of day.

Keywords: circadian rhythm, lipopolysaccharide, STAT proteins, suprachiasmatic nuclei

Obsah

Seznam zkratk.....	1
Pojmy	4
1. ÚVOD.....	5
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1. Cirkadiánní rytmy	7
2.1.1. Organizace cirkadiánního systému u savců	7
2.1.2. Suprachiasmatická jádra	8
2.1.2.1. Struktura SCN	10
2.1.3. Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky	13
2.1.3.1. Primární smyčka.....	13
2.1.3.2. Sekundární smyčka	14
2.1.4. Posttranslační modifikace proteinů hodinového mechanismu	16
2.1.4.1. Kaseinkináza Iε	17
2.1.4.2. Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2.....	17
2.1.4.3. Kináza glykogensyntázy 3β	18
2.2. Signální dráha JAK/STAT	19
2.2.1. Janus kinázy	19
2.2.2. Proteiny STAT	20
2.2.3. Aktivace signální dráhy JAK/STAT	22
2.2.4. Posttranslační modifikace proteinů STAT.....	24
2.2.4.1. Fosforylace.....	24
2.2.4.2. Acetylace.....	24
2.2.4.3. Metylace.....	24
2.2.5. Negativní regulace signální dráhy JAK/STAT	25
2.2.5.1. Supresory cytokinové signalizace	25
2.2.5.2. Proteiny inhibující aktivovaný STAT	25
2.2.5.3. Proteinové tyrosinfosfatázy.....	26
2.2.5.4. Proteasomální degradace.....	27
2.3. Role proteinů STAT3 a STAT5 v cirkadiánním systému.....	27
2.4. Interakce imunitního a cirkadiánního systému.....	28
2.5. Role LPS v cirkadiánním systému a vliv na signální dráhu JAK/STAT	29
2.5.1. LPS jako ligand Toll-like receptorů	29
2.5.1.1. Signalizace TLR4.....	30
2.5.2. Působení LPS na cirkadiánní systém	31
2.5.2.1. Změny v chování a fyziologii vlivem LPS.....	32
2.5.2.2. Změny v SCN vlivem LPS.....	33
2.5.2.2.1. Změny v hladinách a expresi hodinových genů v SCN	33
2.5.2.2.2. Změny v aktivitě neuronů SCN	34
2.5.3. Vliv LPS na signální dráhu JAK/STAT	34
3. CÍLE PRÁCE.....	36

3.1. Přehled specifických cílů	36
Cíl 1: Sledování hladin proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B, jejich lokalizace v buněčných typech SCN potkana a stanovení rytmické exprese mRNA <i>Stat3</i>	36
Cíl 2: Zkoumání účinku LPS na behaviorální rytmy u potkana, na změny v expresi hodinových genů <i>Per1</i>, <i>Per2</i> a <i>Rev-erba</i> a v hladinách pERK1/2 a pGSK3β, v expresi <i>Stat3</i> a hladinách fosforylovaných forem proteinu STAT3 v závislosti na čase aplikace	36
4. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	37
4.1. Seznam použitých publikací.....	37
4.2. Seznam ostatních publikací.....	37
4.3. Podíl na použitých publikacích	39
5. SEZNAM METOD	40
5.1. Laboratorní zvířata	40
5.2. Experimentální paradigma	40
5.2.1. Denní profil hladiny proteinu STAT3, jeho fosforylovaných forem a proteinů STAT5A a STAT5B a lokalizace STAT3, STAT5A a STAT5B v buněčných typech SCN	40
5.2.2. Denní rytmus v expresi <i>Stat3</i> v SCN	41
5.2.3. Účinek intraperitoneální injekce LPS na hladiny fosforylovaných forem proteinu STAT3 a jejich lokalizace v buněčných typech SCN	42
5.2.4. Účinek intraperitoneální injekce LPS na mRNA expresi hodinových genů, <i>Stat3</i> a hladiny fosforylovaných forem proteinů ERK1/2 a GSK3β	43
5.3. Měření lokomoční aktivity	43
5.4. Imunohistochemie plovoucích řezů	44
5.4.1. Fluorescenční imunohistochemie	46
5.5. <i>In situ</i> hybridizace.....	47
5.5.1. Linearizace plazmidu pro přípravu antisense cRNA sondy a radioaktivní značení cRNA sondy pomocí <i>in vitro</i> transkripce.....	47
5.5.2. Prehybridizace	49
5.5.3. Hybridizace, autoradiografie a analýza hybridizačního signálu	49
5.6. Laserová mikrodisekce.....	50
5.7. Izolace RNA a Real-time PCR.....	50
5.8. Analýza a statistické zpracování dat	53
6. VÝSLEDKY	54
6.1. Cíl 1: Sledování hladin proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B, jejich lokalizace v buněčných typech SCN potkana a stanovení rytmické exprese mRNA <i>Stat3</i>	54

6.1.1. Stanovení denního rytmu proteinu STAT3, jeho fosforylovaných forem a proteinů STAT5A a STAT5B v SCN potkana	54
6.1.2. Stanovení denního rytmu v expresi <i>Stat3</i>	56
6.1.3. Identifikace buněčných typů exprimujících protein STAT3 a proteiny STAT5A a STAT5B	57
6.2. Cíl 2: Zkoumání účinku LPS na behaviorální rytmy u potkana, na změny v expresi hodinových genů <i>Per1</i>, <i>Per2</i> a <i>Rev-erba</i> a v hladinách pERK1/2 a pGSK3β, v expresi <i>Stat3</i> a hladinách fosforylovaných forem proteinu STAT3 v závislosti na čase aplikace	58
6.2.1. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na lokomoční aktivitu potkana	58
6.2.2. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese hodinových genů <i>Per1</i> , <i>Per2</i> a <i>Rev-erba</i> v závislosti na čase aplikace	60
6.2.3. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni hladiny proteinů pERK1/2 a pGSK3β v závislosti na čase aplikace	63
6.2.4. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese <i>Stat3</i> v závislosti na čase aplikace.....	65
6.2.5. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na hladiny fosforylovaných forem proteinu STAT3.....	67
7. DISKUZE	70
8. ZÁVĚR	81
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	82
10. PŘÍLOHY - SEZNAM PUBLIKACÍ <i>IN EXTENSO</i>.....	110
10.1. Příloha A.....	111
10.2. Příloha B.....	122

Seznam zkratek

1W ANOVA	jednocestná analýza rozptylu, one-way ANOVA
2W ANOVA	dvoucestná analýza rozptylu, two-way ANOVA
3V	3. mozková komora
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
AVP	arginin-vazopresin
BDNF	z mozku odvozený neurotrofní faktor
BMAL1/ <i>Bmal1</i>	<i>brain and muscle ARNT-like 1</i> protein/gen
Ca ²⁺	vápenaté ionty
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCD	tzv. coiled-coil doména
CCGs	hodinami kontrolované geny
cDNA	komplementární DNA
CKI ϵ	kaseinkináza I ϵ
CLOCK/ <i>Clock</i>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i> protein/gen
cpm	počet za minutu, <i>counts per minute</i> , pro stanovení inkorporace ³⁵ S- UTP do sondy
CRE	<i>cAMP response element</i> , oblast genu
CREB	CRE-vazebný protein, <i>cAMP response element-binding protein</i>
CRY/ <i>Cry</i>	kryptochrom protein/gen
CT	cirkadiánní čas
CTP	cytidintrifosfát
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DBD	DNA vazebná doména
DBP/ <i>Dbp</i>	protein vázající D-element albuminu/gen
DD režim	<i>dark-dark</i> , světelný režim tma-tma
DEPC-PBS	PBS s diethylpyrokarbonátem
DMH	dorsomediální jádro hypotalamu
dmSCN	dorsomediální část SCN
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor

ERK1/2	extracelulárním signálem regulovaná kináza, izoforma 1/2
FERM doména	<i>four-point-one, ezrin, radixin, moesin</i> doména
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GAS	interferon γ aktivovaná sekvence
GFAP	protein vyskytující se v gliích
GH	růstový hormon
GHR	receptor pro růstový hormon
GHT	genikulohypotalamický trakt
GRP	peptid uvolňující gastrin
GSK3 β	kináza glykogensyntázy 3 beta
GTP	guanosintrifosfát
IFN β	interferon beta
IFN γ	interferon gamma
IGF-1/ <i>Igf-1</i>	inzulinu podobný růstový faktor/ <i>gen</i>
IGL	intergenikulární listek talamu
IL	interleukin
ipRGC	specializované fotosenzitivní gangliové buňky
IRF3	regulační faktor pro interferon 3
JAKs	Janus kinázy
JH	homologní úsek JAK kinázy
LBP	lipopolysacharid vážící protein
LD	spojovací doména
LD režim	<i>light-dark</i> , světelný režim světlo-tma
LHA	laterální hypotalamická oblast
LMD	laserová mikrodisekce
LPS	lipopolysacharid
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MD-2	myeloidní diferenciační protein 2
MR	mediální rafeální jádro
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
miRNA	malé nekódující RNA
MSK1	mitogenem a stresem aktivovaná proteinkináza
mTOR	savčí serin/threoninová kináza, <i>mammalian target of rapamycin</i>

MyD88	myeloidní diferenciační faktor 88
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	N-metyl-D-asparagová kyselina
<i>Npas2</i>	gen neuronálního proteinu 2 obsahujícího PAS doménu
NPY	neuropeptid Y
NTD	N-terminální doména
OC	optické chiasma
OD	optická densita
PACAP	hypofyzární polypeptid aktivující adenylátcyklázu
PBS	fyzilogický roztok
PEN	polyethylennaftalát
PER/ <i>Per</i>	period protein/gen
pERK1/2	fosforylovaná forma kinázy ERK1/2
PFA	paraformaldehyd
pGSK3 β	fosforylovaná forma kinázy glykogensyntázy 3 beta
PI3K/Akt	fosfatidylinositol-3-kináza/proteinkináza B
PIAS	proteiny inhibující aktivovaný STAT
pSTAT3(S)	fosforylovaná forma proteinu STAT3 na serinu 727
pSTAT3(Y)	fosforylovaná forma proteinu STAT3 na tyrosinu 705
pSTAT5B	fosforylovaná forma proteinu STAT5B
PTP	proteinová tyrosinfosfatáza
PVN	paraventrikulární jádro
RHT	retinohypotalamický trakt
RRE	Rev-reb α /ROR α responsní sekvence
SCN	suprachiasmatická jádra
SEM	standartní chyba průměru
Ser727	serin na pozici 727
SH2	<i>Src-homology</i> 2 doména
SOCS	supresory cytokinové signalizace
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STAT	signální přenašeč a aktivátor transkripce
TAD	transaktivační doména

TCA	kyselina trichloroctová
TIR	Toll/interleukin 1 receptor
TIRAP	adaptorový protein obsahující Toll/interleukin 1 receptorovou doménu
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	nádory nekrotizující faktor alfa
TNFR	receptor pro TNF- α
TRAM	adaptorová molekula související s adaptorem TRIF
Treg	regulační T lymfocyty
TRIF	adaptorový protein obsahující doménu TIR a indukující expresi IFN β
Tyr705	tyrosin na pozici 705
UTP	uridintrifosfát
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
VLPO	ventrolaterální preoptická oblast hypotalamu
vISCN	ventrolaterální část SCN
ZT	zeitgeber time, experimentální čas

Pojmy

cirkadiánní čas odpovídá periodě volně běžících cirkadiánních hodin, CT0 je čas definující počátek aktivity u denních organismů a CT12 je čas stanovený jako počátek aktivity u nočních organismů

„free floating“ imunohistochemie metoda molekulární biologie založená na imunohistochemickém barvení tkáňových řezů, které nejsou pevně uchycené na podložních sklech, ale jsou přenášeny mezi roztoky, takzvaně „volně plavou“ v inkubačních roztocích

„zeitgeber“ čas odpovídá vnějšímu času danému pravidelným střídáním světla a tmy v 24hodinovém intervalu, ZT0 je čas definující počátek světlé fáze dne a počátek aktivity u denních organismů, ZT12 je čas definující počátek tmavé fáze dne a počátek aktivity nočních organismů

1. Úvod

Cirkadiánní rytmy se vyvinuly jako odpověď na střídající se podmínky dne a noci, v důsledku otáčení Země kolem své osy. Cirkadiánní rytmy jsou biologické rytmy, které se opakují s periodou blízkou 24 hodinám. Tyto rytmy jsou endogenní, to znamená, že přetrvávají i v konstantních podmínkách, kde k pravidelnému střídání světla a tmy nedochází. Světlo je nejsilnější synchronizátor, který slouží k nastavení 24hodinové periody. Tato perioda může však být nastavována také nesvětelnými podněty, například příjmem potravy. Sídlem centrálního oscilátoru, který řídí denní rytmy v chování a fyziologii jsou u savců suprachiasmatická jádra hypotalamu (SCN). Ta pak prostřednictvím neuronálních a humorálních signálů seřizují periferní oscilátory v dalších strukturách mozku a periferních orgánech tak, aby probíhaly důležité fyziologické děje ve správnou denní dobu.

Existuje mnoho studií, které prokazují, že SCN ovlivňuje také imunitní systém a řídí imunitní funkce. V lymfatických orgánech a také v jednotlivých buňkách imunitního systému byl nalezen molekulární mechanismus cirkadiánních oscilací, který je prostřednictvím humorálních a neuronálních signálů pod kontrolou SCN. Mnoho buněk imunitního systému vykazuje změny v počtu v závislosti na denní době a jsou pozorovány denní rozdíly v tvorbě a hladinách cytokinů. Známý jsou také denní rozdíly v citlivosti organismu k různým patogenům a látkám vyvolávajícím zánětlivou odpověď. Na druhou stranu existují studie, které popisují změny v chování, aktivitě a příjmu potravy, které jsou odrazem změn přímo na úrovni centrálního oscilátoru v SCN, a tyto změny jsou způsobené mediátory imunitního systému, jako jsou cytokiny, nebo jinými faktory aktivujícími zánětlivou odpověď, jako je například lipopolysacharid (LPS). V dnešní době se tedy předpokládá, že působení cirkadiánního a imunitního systému je vzájemné.

LPS je molekula tvořící hlavní složku vnější membrány gramnegativních bakterií. Současně je považován za významný endotoxin aktivující imunitní systém. Vazbou LPS na Toll-like receptor 4 (TLR4) dochází k aktivaci signální dráhy a k tvorbě cytokinů. Cytokiny poté vedou k aktivaci jedné z nejstudovanějších a velmi důležitých nitrobuněčných signálních drah, kterou je signální dráha JAK/STAT. Fosforylace molekul této signální dráhy vede k jejich aktivaci a vstupu proteinů STAT do jádra, kde vazbou na DNA ovlivňují transkripci genů.

Cílem této disertační práce bylo studium signální dráhy JAK/STAT v SCN potkana. Zaměřili jsme se především na cirkadiánní regulaci exprese genu a fosforylaci proteinu STAT3 v SCN. Exprese a funkce STAT3 může být modifikována celou řadou faktorů – růstových faktorů, hormonů, např. leptinem apod., největší změny ale vykazuje v reakci na inflamatorní stimulaci. Druhým cílem této práce tedy bylo zjistit, zda akutní systémové podání LPS může měnit expresi a fosforylaci STAT3 v SCN a zprostředkovávat tak odpověď cirkadiánního pacemakeru v SCN na systémovou bakteriální infekci.

2. Literární přehled

2.1. Cirkadiánní rytmy

Cirkadiánní rytmy probíhají ve všech živých organismech od kvasinek až po savce. Jsou generovány biologickými hodinami, které tak kontrolují velké množství funkcí v lidském těle, včetně cyklu spánku a bdění, tělesné teploty, krevního tlaku, tvorby hormonů, jako jsou například kortizol a melatonin, a také imunitního systému (Coogan a Wyse, 2008; Gubin et al., 2017; Ibuka a Kawamura, 1975). Cirkadiánní rytmy mají endogenní podstatu podmíněnou vzájemnou interakcí takzvaných hodinových genů a jejich proteinů. V neperiodickém prostředí rytmy volně běží a perioda volně běžícího rytmu např. v expresi hodinových genů je velmi blízká, ale ne přesně rovna, 24 hodinám. Tato odchylka je korigována vnějšími synchronizačními signály (z něm. Zeitgeber). Nejsilnějším synchronizačním signálem prostředí je střídání světla a tmy. Funkci zeitgeberu může však plnit také příjem potravy, sociální interakce, lokomoční aktivita, nebo nucené vybuzení aktivity (Aschoff et al., 1971; Damiola et al., 2000; Hastings et al., 1998; Mendoza, 2007; Mrosovsky, 1996; Stokkan et al., 2001).

2.1.1. Organizace cirkadiánního systému u savců

Cirkadiánní systém umožňuje organismům předvídat stále se opakující změny v prostředí, například střídání světla a tmy, teplotní změny a změny v přísunu potravy, a adaptovat se na ně. Cirkadiánní systém je uspořádán hierarchicky. U savců je centrální pacemaker biologických hodin umístěn v suprachiasmatických jádrech (SCN) anteriorního hypotalamu (obr. 1, Stephan a Zucker, 1972) a nastavuje fázi periferních oscilátorů v ostatních částech mozku a tkáních v těle (Ralph et al., 1990; Sakamoto et al., 1998). Úloha SCN jako centrálního pacemakeru a jejich nadřazenost nad periferními oscilátory byla prokázána již v 70. a 80. letech minulého století několika studiemi na hlodavcích. Těmito studiemi bylo zjištěno, že léze SCN ruší cirkadiánní rytmus v pohybové aktivitě, v příjmu potravy (Stephan a Zucker, 1972), v produkci kortikosteronu (Moore a Eichler, 1972) a elektrické aktivitě neuronů (Inouye a Kawamura, 1979) a také má za následek úplnou absenci pravidelného rytmu spánku a bdění (Ibuka a Kawamura, 1975). Transplantace embryonálních SCN hlodavci, kterému byla předtím SCN odstraněna, obnoví rytmus v pohybové aktivitě (Lehman et al., 1987), a to s délkou periody dárce (Ralph et al., 1990).

Savčí cirkadiánní systém je složený z mnoha buněčných oscilátorů, které musí být synchronizovány pomocí centrálního pacemakeru. Každá buňka lidského těla je považována za oscilátor. Je známo, že dokonce i bezjaderný erytrocyt vykazuje cirkadiánní rytmy v redoxních dějích peroxiredoxínů a může tedy fungovat jako oscilátor (O'Neill a Reddy, 2011). Periferní oscilátory byly objeveny v různých orgánech a tkáních kultivovaných *in vitro*, jako jsou játra, srdce, ledviny, plíce, pankreas, slezina, žaludek, kosterní svalstvo, nadledviny, štítná žláza nebo rohovka (Yamamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004).

Jednotlivé buňky v periferních tkáních jsou sice schopné generování cirkadiánních oscilací, nejsou však citlivé na světlo. K synchronizaci těchto oscilátorů s denní dobou dochází proto prostřednictvím neuronálních a humorálních signálů vysílaných SCN a/nebo přímo, nefotickými podněty. Například časovaný příjem potravy je nejdůležitějším zeitgeberem pro periferní oscilátory v metabolických orgánech savců (Schibler et al., 2003). Mezi signály synchronizující periferní hodiny patří také teplota, jejíž rytmus je však také zajišťován hlavním pacemakerem v SCN (Brown et al., 2002).

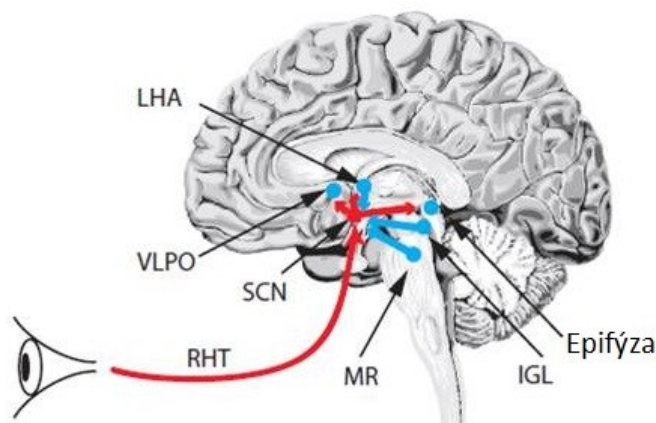
2.1.2. Suprachiasmatická jádra

SCN jsou párová struktura tvořená u potkana z 16 000 až 20 000 neuronů (Güldner, 1983; van den Pol, 1980). Nacházejí se těsně nad optickým chiasma po obou stranách třetí mozkové komory. SCN přijímají informaci o světle přímo z retiny retinohypotalamickým traktem (RHT; obr. 1; Albrecht, 2012; Moore a Lenn, 1972). Retina obsahuje kromě klasických fotoreceptorů (tyčinek a čípků) nezbytných pro vidění také specializované fotosenzitivní gangliové buňky (ipRGC) obsahující fotopigment melanopsin. Tyto buňky tvoří svými axony RHT, který vede přímo do SCN (Berson et al., 2002; Panda et al., 2005). Aktivace ipRGC vede k uvolnění glutamátu a hypofyzárního polypeptidu aktivujícího adenylátcyklázu (PACAP) z presynaptického zakončení ipRGC. Glutamát se váže na N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory na postsynaptické membráně neuronu SCN a umožní tím tok vápenatých iontů (Ca^{2+}) do neuronu SCN (Colwell et al., 1991). PACAP se váže na své receptory ve vlSCN a stimuluje tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP; Hannibal et al., 1997). cAMP spolu se zvýšenou koncentrací Ca^{2+} vede k aktivaci extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK), která fosforyluje transkripční faktor CREB (z angl. cAMP response element-binding protein, CRE-vazebný protein) na serinu na pozici 133 a 142 (Gau et al.,

2002; Ginty et al., 1993; Obrietan et al., 1999). Fosforylovaný CREB se váže do promotoru genů *Per* a *c-Fos*, které obsahují CRE vazebnou sekvenci (z angl. cAMP response element) a tím dochází k aktivaci jejich exprese a k indukci fázových posunů (Morris et al., 1998; Trávníčková-Bendová et al., 2002). K přenastavení hodin světlem však dochází jen působením světla v době noci či subjektivní noci, o které hovoříme, pokud je organismus v neperiodických podmínkách, typicky stále tmy. Působení světla v době subjektivního dne nevyvolá fázové změny. Světelný pulz působící časně v noci vyvolává fázové zpoždění, pozdní noční pulzy a světelné pulzy zrána způsobují fázové předběhnutí hodin (Daan a Pittendrigh, 1976).

Informace o světle, ale také informace o nesvětelných změnách v prostředí, jsou vedeny do SCN také genikulohypotalamickým traktem (GHT) z intergenikulárního lístku talamu (IGL). V tomto přenosu může hrát úlohu také PACAP (Hannibal et al., 1997), ale uplatňuje se zde především neuropeptid Y (NPY) pravděpodobně společně s kyselinou γ -aminomáselnou (GABA) a enkefaliny (Morin a Blanchard, 1995; Morin a Blanchard, 2001). Elektrická stimulace IGL vede k uvolnění NPY z presynaptického zakončení GHT, což vede k vazbě NPY na své receptory a k aktivaci postsynaptického neuronu SCN. Stimulace IGL nebo exogenní aplikace NPY do SCN v době subjektivního dne indukuje poměrně velké fázové předběhnutí, zatímco stimulace na začátku subjektivní noci vede k poměrně malému fázovému zpoždění (Albers a Ferris, 1984; Biello et al., 1994; Rusak et al., 1989). Tyto fázové změny jsou pravděpodobně způsobeny modulačními účinky NPY, které způsobují změny v expresi hodinových genů *Per* v neuronech SCN (Maywood et al., 1999; Maywood et al., 2002).

SCN může přijímat nesvětelné informace také prostřednictvím serotonergní dráhy, která vede z mediálního rafeálního jádra (MR; Hay-Schmidt et al., 2003; Moga a Moore, 1997). Uvolnění serotoninu vede k jeho vazbě na serotoninové receptory, které jsou přítomné v SCN. Elektrická stimulace MR, stejně jako exogenní aplikace serotoninu a/nebo agonistů serotoninových receptorů v době subjektivního dne způsobuje fázové předběhnutí v lokomoční aktivitě a také aktivitě neuronů SCN, které je pravděpodobně způsobeno změnami v expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* (Horikawa et al., 2000; Meyer-Bernstein a Morin, 1999; Prosser, 2003).



Obr. 1: Lokalizace hlavního cirkadiánního pacemakeru v mozku člověka a aferentní a eferentní projekce. SCN jsou umístěna v anteriorním hypothalamu. Informace o světle je vedena retinohypotalamickým traktem (RHT) přímo do SCN, které poté komunikuje s dalšími oblastmi zapojenými například v regulaci cyklu spánku a bdění (ventrolaterální preoptická oblast hypothalamu - VLPO, laterální hypothalamická oblast - LHA) a/nebo uvolňování melatoninu (epifýza). Další dráha, avšak nepřímá, je vedena přes intergenikulární listek talamu (IGL) a odtud genikulohypotalamickým traktem (GHT) do SCN. Tato dráha integruje jak světelné, tak především nesvětelné podněty. Třetí, také nepřímá, dráha slouží pro přenos především nesvětelné informace prostřednictvím mediálního rafeálního jádra (MR). Převzato a upraveno podle Farajnia et al., 2013.

Kromě neuronů také glie SCN, zejména astrocyty, vykazují rytmickou expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* (Prolo et al., 2005). Bylo také ukázáno, že astrocyty nejsou pouze podpůrnými buňkami, ale jsou nezbytné pro tvorbu a udržování cirkadiánních rytmů. V SCN vykazují robustní cirkadiánní rytmus v intracelulárních hladinách Ca^{2+} , který je v antifázi s neuronálními hladinami Ca^{2+} . Dále byly v SCN pozorovány cirkadiánní oscilace v hladinách extracelulárního glutamátu, které pozitivně korelují s rytmem astrocytů v uvolňování Ca^{2+} . Z těchto nálezů vyplývá, že astrocyty jsou metabolicky aktivní během noci a uvolňováním glutamátu do extracelulárního prostředí inhibují aktivitu neuronů v SCN a tím se přímo podílí na udržování cirkadiánních rytmů (Brancaccio et al., 2017).

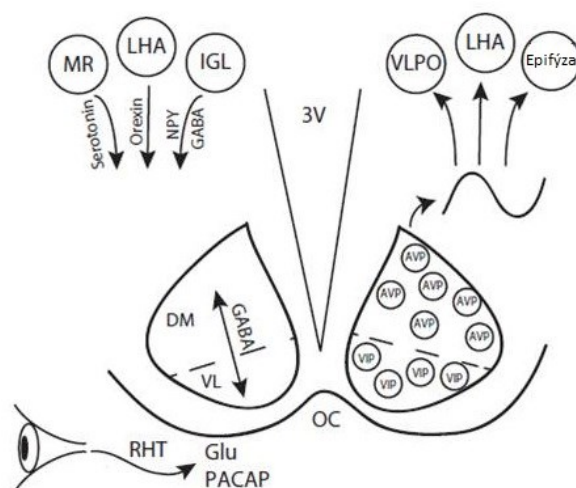
2.1.2.1. Struktura SCN

SCN se strukturně i funkčně rozděluje na ventrolaterální část (vlSCN, nazývanou také „core“) a dorsomediální část (dmSCN, nazývanou také „shell“). Obě části jsou definované lokalizací a expresí specifických neuropeptidů a rozdíly v aferentních/vstupních a eferentních/výstupních drahách. Většina z peptidů není

rovnoměrně rozptýlena po celém SCN, ale je uspořádána do klastrů. Nejlépe prozkoumanými molekulami jsou vazoaktivní intestinální peptid (VIP) a peptid uvolňující gastrin (GRP) nacházející se ve vlSCN a arginin-vazopresin (AVP), jehož lokalizace je omezena především na dmSCN. V obou částech SCN se nachází GABA (obr. 2; Abrahamson a Moore, 2001; Moore a Speh, 1993).

Část vlSCN přijímá vstupní informace o světle přímo z retiny prostřednictvím RHT, dále pak nepřímo GHT z IGL. Do vlSCN dále vedou aferentní dráhy z MR a také bylo demonstrováno zapojení laterální hypotalamické oblasti (LHA) uvolňující neuropeptid orexin v přenosu nesvětelné informace do SCN (obr. 2; Belle et al., 2014; Date et al., 1999; Klisch et al., 2009). Část dmSCN přijímá většinu vstupních informací z vlSCN, dalších oblastí hypotalamu a limbického systému (Moga a Moore, 1997).

Výstupní dráhy vedou ze SCN do řady dalších struktur mozku. Jedna z důležitých eferentních drah je vedena přes subparaventrikulární zónu a dorsomediální jádro hypotalamu (DMH). Subparaventrikulární zóna je zásadní pro cirkadiánní regulaci tělesné teploty, DMH je klíčový pro udržování cirkadiánních rytmů ve spánku a bdění, příjmu potravy či pohybové aktivitě, neboť působí jako převodní struktura mezi SCN a ventrolaterální preoptickou oblastí hypotalamu (VLPO), regulující spánek a laterální hypotalamickou oblastí (LHA), zodpovědnou za udržování bdělosti a příjem potravy (Chou et al., 2003). SCN také vysílá přímé eferentní projekce do VLPO a LHA (Abrahamson et al., 2001; Chou et al., 2002), které však nejsou příliš četné, a tudíž se předpokládá, že cirkadiánní regulace těchto oblastí je zprostředkována spíše multisynaptickými drahami než přímým spojením se SCN (Novak a Nunez, 2000; Sakurai et al., 2005). Další z významných eferentních drah SCN je multisynaptická dráha vedoucí přes paraventrikulární jádro hypotalamu (PVN) do epifýzy, která je zodpovědná za rytmické uvolňování hormonu melatoninu (obr. 1 a 2).



Obr. 2: Organizace SCN a jejich nejvýznamnější aferentní a eferentní dráhy. SCN jsou funkčně uspořádány do dvou odlišných oblastí – dorsomediální (DM) a ventrolaterální (VL). DM oblast vymezují buňky, které tvoří arginin-vazopresin (AVP). Buňky produkující vazoaktivní intestinální peptid (VIP) se nacházejí převážně ve VL oblasti. Tyto neuropeptidy jsou spolu s GABA zapojeny do synchronizace a interakce neuronů v SCN. Informace o světle je vedena do SCN prostřednictvím RHT, kde dochází na synapsích k uvolňování glutamátu (Glu) a hypofyzárního polypeptidu aktivujícího adenylátcyklázu (PACAP). SCN přijímají různé vstupy (např. z IGL, LHA nebo MR) a přenáší výstupy do několika mozkových jader (např. VLPO, LHA) a cílových struktur (např. epifýza). GABA – kyselina γ -aminomáselná, IGL – intergenikulární listek talamu, LHA – laterální hypothalamická oblast, MR – mediální rafeální jádro, RHT – retinohypotalamický trakt, VLPO – ventrolaterální preoptická oblast hypothalamu. Převzato a upraveno podle Farajnia et al., 2013.

Jednotlivé neurony SCN vykazují denní rytmy v elektrické aktivitě a v expresi hodinových genů. Dřívější *in vitro* studie naznačily, že téměř každý z 20 000 neuronů SCN představuje samostatný oscilátor vykazující odlišnou endogenní periodu a fázi (Welsh et al., 1995). Aby docházelo ke generování robustních rytmů se stejnou periodou a fází, musí být jednotlivé neurony mezi sebou synchronizovány. Bylo navrženo několik mechanismů, jakými může docházet ke komunikaci jednotlivých buněk v rámci SCN, k jejich synchronizaci a tvorbě robustních rytmů. Za významný neurotransmiter v synchronizaci jednotlivých neuronů SCN je považována zejména GABA. Je produkována většinou buněk SCN (Moore a Speh, 1993), a její exogenní aplikace vede k synchronizaci elektrické aktivity buněk SCN. Toto působení je zprostředkováno receptory GABA_A, které se také hojně nachází v celém SCN (Liu a Reppert, 2000). Pro synchronizaci jednotlivých neuronů a udržování oscilací je nezbytný také VIP. VIP je produkován především neurony vlSCN a vazbou na své VPAC₂ receptory v dmSCN

synchronizuje rytmickou aktivitu neuronů (Aton et al., 2005). K synchronizaci neuronů SCN dochází pravděpodobně také prostřednictvím elektrických synapsí, které jsou tvořeny konexiny, neboť byla jedna z izoforem, konkrétně konexin 32, nalezena v SCN (Colwell, 2000).

Kromě komunikace vlSCN s dmSCN dochází také ke vzájemné komunikaci mezi pravým a levým SCN, což je patrné ze studia neuronálních projekcí (Leak et al., 1999; Pickard, 1982). Tato komunikace je pravděpodobně vedena především hlavním excitačním neurotransmiterem glutamátem působícím přes své ionotropní AMPA receptory, avšak GABA, VIP a AVP mohou ke vzájemné komunikaci pravého a levého SCN přispívat také (Michel et al., 2013).

2.1.3. Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky

Transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky hodinových genů a jejich proteinů v buňkách SCN jsou nezbytným molekulárním základem pro generování cirkadiánních oscilací. Mezi základní komponenty pro tvorbu a udržování cirkadiánních rytmů prostřednictvím SCN patří hodinové geny *Clock* (z angl. *circadian locomotor output cycles kaput*), *Bmal1* (z angl. *brain and muscle ARNT-like 1*), *Period (Per) 1* a *2* a *Kryptochrom (Cry) 1* a *2*. Tyto hodinové geny patří do rodiny proteinů obsahujících doménu bHLH-PAS, která jim umožňuje nejen vytvářet dimery, ale také vázat se na DNA (Gekakis et al., 1998; Guissoni Campos et al., 2017; Kume et al., 1999).

2.1.3.1. Primární smyčka

Hlavní zpětnovazebná smyčka hodinového mechanismu sestává z pozitivních elementů BMAL1 a CLOCK, které spolu na začátku subjektivního dne tvoří heterodimer. Vazba CLOCK:BMAL1 heterodimeru na E-box v promotoru hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Per3* a *Cry1*, *Cry2* aktivuje jejich genovou expresi (Gekakis et al., 1998). Během subjektivního dne se pak nasyntetizované proteiny PER a CRY hromadí v cytoplasmě, přímou interakcí spolu vytváří dimery, které jsou pak translokovány do jádra. V průběhu subjektivní noci dochází v jádře k interakci obou typů dimerů, což vede k inhibici heterodimeru CLOCK:BMAL1 a tím i k inhibici transkripce *Per* a *Cry* (obr. 3). Dimery PER a CRY tedy působí jako negativní modulátory své vlastní exprese (Kume et al., 1999).

BMAL1 slouží jako pozitivní element a jako jediný je považován za naprosto esenciální a nezastupitelný v hodinovém mechanismu oscilací, jeho mutace vede k úplné

ztrátě rytmicity (Bunger et al., 2000). Přesto existují práce, které naznačují, že jeho úloha v cirkadiálních oscilacích může být částečně zastoupena jeho homologem BMAL2 (Sasaki et al., 2009). Exprese BMAL2 je regulována prostřednictvím BMAL1, neboť knockout v hodinovém genu *Bmal1* způsobí snížení genové exprese *Bmal2*. Konstitutivní exprese BMAL2 u knockoutu *Bmal1* obnoví rytmus v lokomoční aktivitě, ale nevede k obnovení rytmicity v SCN (Shi et al., 2010). Pro protein CLOCK byl nalezen v předním mozku jeho funkční homolog, NPAS2, který s proteinem BMAL1 vytváří heterodimery. Heterodimery vazbou na E-box sekvenci v promotoru aktivují genovou expresi *Per* a *Cry*, jejichž proteinové produkty pak zpětnovazebně inhibují aktivitu heterodimeru NPAS2:BMAL1 (DeBruyne et al., 2007; Reick et al., 2001).

2.1.3.2. Sekundární smyčka

Vedlejší zpětnovazebná smyčka hodinového mechanismu má vliv především na expresi hodinového genu *Bmal1*, ale také funkčního homologu hodinového genu *Clock*, *Npas2* (Crumbley et al., 2010). Této smyčky se účastní jaderné receptory REV-ERB α a ROR α , které fungují jako transkripční faktory a vzájemně kompetují o vazebné místo RRE v promotoru *Bmal1*. REV-ERB α vazbou do promotoru exprese *Bmal1* inhibuje, zatímco ROR α působí na expresi *Bmal1* aktivačně (obr. 3). Regulace exprese *Bmal1* prostřednictvím jaderných receptorů REV-ERB a ROR hraje důležitou roli v udržování přibližně 24hodinové periody (Guillaumond et al., 2005; Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004). Pro vazbu na promotorovou RRE sekvenci *Npas2* mají jaderné receptory REV-ERB α a ROR α nižší afinitu než v případě *Bmal1*, neboť jsou sekvence RRE v promotoru *Npas2* odděleny delším spojovacím úsekem, proto REV-ERB α neblokuje přímo transkripci, ale pouze blokuje aktivační účinek ROR α (Crumbley et al., 2010).

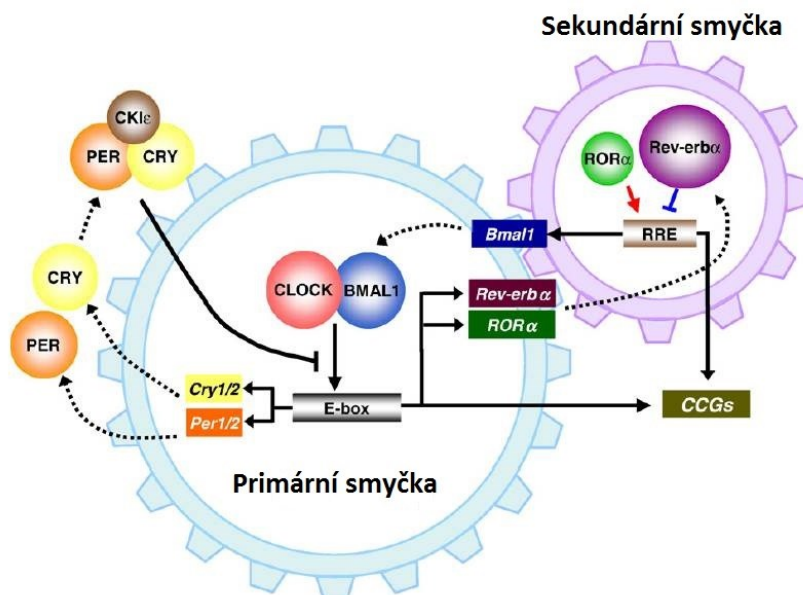
Hladiny mRNA hodinových genů *Per* a *Cry* jsou vysoké během subjektivního dne (Field et al., 2000; Kume et al., 1999; Shearman et al., 1997; Tei et al., 1997). Naproti tomu, hladina mRNA hodinového genu *Bmal1* narůstá až v době subjektivní noci (Honma et al., 1998). Genová exprese pozitivního elementu je tak udržována v antifázi s negativními elementy zpětnovazebné smyčky hodinového mechanismu a tím je utvářena přibližně 24hodinová perioda.

Hodinový mechanismus se také podílí na transkripci takzvaných hodinami kontrolovaných genů (z angl. *clock controlled genes*, CCGs; obr. 3). Tyto geny jsou rytmické, nejsou však přímo součástí hlavního hodinového mechanismu, ale řídí výstupní

rytmy v chování a fyziologii. CCGs jsou tkáňově specifické a dané tkáně mohou obsahovat až 10 % CCGs ze všech genů. Jedním z příkladů CCGs je gen pro *AVP*, jehož rytmická exprese byla nalezena v SCN a je řízena vazbou heterodimeru CLOCK:BMAL1 k E-boxu v jeho promotoru. Během dne tedy dochází k expresi *AVP*, která je utlumena v noci inhibicí CLOCK:BMAL1 heterodimeru dimerem negativních regulátorů PER a CRY (Jin et al., 1999). Dalším příkladem CCGs je gen pro protein vázající D-element (D-box) albuminu (*Dbp*), jehož rytmická exprese byla nalezena také v SCN (Lopez-Molina et al., 1997), hraje ale významnou roli především v periferních tkáních. Rytmická exprese *Dbp* je řízena také vazbou pozitivních elementů BMAL1 a CLOCK do E-boxu v promotoru *Dbp* (Ripperger et al., 2000). DBP patří mezi transkripční faktory, které se dále podílejí na aktivaci transkripce některých dalších CCGs a tím přenáší rytmickou expresi dalším genům. Hodinové geny a CCGs nezprostředkovávají aktivaci transkripce pouze vazbou na promotorové E-boxy, ale mohou aktivovat transkripci genů také vazbou na D-box či RRE sekvenci v promotoru genů (Ueda et al., 2005; Yamamoto et al., 2004).

Expresí hodinových genů a s tím spojené transkripčně-translační zpětnovazební smyčky nebyly popsány pouze v neuronech SCN, ale také v mnoha dalších oblastech mozku a autonomních oscilátorech, jako jsou například PVN, hipokampus, kortex, mozeček, čichové laloky, retina či epifyza (Asai et al., 2001; Honma et al., 1998; Jilg et al., 2010; Namihira et al., 1999; Pramong et al., 2015; Shearman et al., 1997) a také v periferních orgánech, jako jsou například srdce, játra, ledviny, pankreas nebo plíce (Damiola et al., 2000; Mühlbauer et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Young et al., 2001). Expresí hodinových genů byla prokázána také v buňkách imunitního systému, jako jsou makrofágy (Hayashi et al., 2007; Keller et al., 2009; Silver et al., 2012), lymfocyty (Du et al., 2005), žírné buňky (Baumann et al., 2013; Wang et al., 2011) NK buňky (Arjona a Sarkar, 2005), eozinofilní granulocyty (Baumann et al., 2013), dendritické buňky a B lymfocyty (Silver et al., 2012), ale také ve slezině, mízních uzlinách (Fortier et al., 2011; Keller et al., 2009) a kostní dřeni (Chen et al., 2000). Oscilace v expresi hodinových genů byla pozorována také v kulturách fibroblastů (Balsalobre et al., 1998). Transkripčně-translační zpětnovazební smyčky hodinových genů v dalších oblastech mozku a periferních orgánech jsou zodpovědné za tkáňově specifickou časovou regulaci genové exprese. Expresí hodinových genů v periferních strukturách však bývá fázově posunuta oproti expresi v SCN. SCN jsou důležitá pro správnou synchronizaci hodin v periferních strukturách a tyto struktury informují prostřednictvím neuronálních nebo humorálních

signálů o vnějším solárním čase. Hodiny v periferních orgánech mohou být kromě signálů ze SCN synchronizovány také například časovaným příjmem potravy (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001).



Obr. 3: Schéma molekulárního mechanismu hodin. Savčí cirkadiánní oscilátor je složen ze dvou vzájemně propojených transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček. Heterodimer CLOCK:BMAL1, který je nedílnou součástí primární smyčky, nasedá v jádře na E-box promotorovou sekvenci genů a zprostředkovává transkripci negativních regulátorů Per a Cry. PER a CRY proteiny se tak hromadí v cytoplasmě a tvoří dimery, které vstupují do jádra a inhibují zde komplex CLOCK:BMAL1 a tím potlačují také svoji vlastní transkripci. Kromě toho dimer CLOCK:BMAL1 také řídí transkripci jaderných receptorů RORα a Rev-erba, které regulují hladiny Bmal1 mRNA kompetitivním působením na RRE sekvenci v Bmal1 promotoru. Tímto mechanismem jsou také řízeny hladiny hodinami kontrolovaných genů (CCGs) a dochází tak ke generování pravidelných výstupních rytmtů. Převzato a upraveno podle Chung et al., 2011.

2.1.4. Posttranslační modifikace proteinů hodinového mechanismu

Posttranslační modifikace hlavních komponent hodinového mechanismu tvoří jeho nezbytnou součást, neboť zabraňují akumulaci proteinů v buňce a udržují trvalost cirkadiánních oscilací. Akumulace by mohla vést ke ztrátě rytmicity v genové expresi. Zejména pak fosforylace produktů hodinových genů reguluje jejich stabilitu, podporuje translokaci proteinových dimerů do jádra a tím moduluje délku periody cirkadiánního cyklu.

2.1.4.1. Kaseinkináza Iε

Jednou z významných regulačních kináz, která je klíčovou součástí hodinového mechanismu u savců, je kaseinkináza Iε (CKIε). CKIε se podílí na fosforylaci proteinů PER, což má za následek ubiquitinylation PER1 a PER2 a jejich následnou degradaci v proteasomu (Akashi et al., 2002; Eide et al., 2005). Mutace v genu pro CKIε (*tau* mutace) umožňuje také vazbu na proteiny PER1 a PER2, avšak vede ke zrychlené fosforylaci a také degradaci proteinů PER, a tudíž také ke zkrácení periody cirkadiálních rytmů (Gallego et al., 2006; Lowrey et al., 2000; Ralph a Menaker, 1988). Proteiny BMAL1 a CRY jsou také substráty pro CKIε. Fosforylace CRY prostřednictvím CKIε nastává v interakci CRY s PER a v tomto komplexu je pak CKIε translokována do jádra, kde fosforyluje BMAL1 a tím přímo ovlivňuje BMAL1-dependentní transkripci (Eide et al., 2002). CKIε zřejmě nevykazuje rytmickou expresi v mRNA ani na úrovni proteinů v průběhu cirkadiálního cyklu (Ishida et al., 2001; Lee et al., 2001), avšak robustní cirkadiální rytmus v její aktivitě má maximum na začátku subjektivní noci, což koreluje s expresí proteinů PER2 a CRY2, a CKIε může být klíčovým prvkem ve světelné synchronizaci (Agostino et al., 2008). Světlo působící v době subjektivní noci způsobuje zpožděnou indukci CKIε mRNA oproti světlem indukované expresi *Per1*, což může hrát roli ve světlem-indukovaných fázových posunech (Ishida et al., 2001).

2.1.4.2. Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2

Mitogenem aktivované proteinkinázy jsou důležité molekuly pro intracelulární přenos signálu a hrají rozhodující role v širokém spektru buněčných pochodů. Jednou z důležitých mitogenem aktivovaných proteinkináz je extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (ERK1/2), která ve fosforylovaném, tedy aktivovaném stavu (pERK1/2) vykazuje cirkadiální rytmus v SCN s vyšší expresí v dmSCN v době subjektivního dne na rozdíl od vyšší exprese ve vlSCN v době subjektivní noci, podobně i v podmínkách periodicky se střídajícího světla a tmy (Lee et al., 2003; Pačesová et al., 2015). Po přerušení spojení SCN s retinou vymizí exprese pERK1/2 ve vlSCN, což naznačuje, že rytmus v pERK1/2 je závislý na přímém spojení vlSCN s retinou (Lee et al., 2003). Aplikace světelných pulzů v době subjektivní noci má také rozdílný účinek na expresi pERK1/2 ve vlSCN a dmSCN (Nakaya et al., 2003). ERK1/2 se také účastní posttranslačních modifikací proteinových produktů hodinových genů (Sanada et al., 2002; Sanada et al., 2004). pERK1/2 fosforyluje pozitivní element hodinového

mechanismu BMAL1 na threoninu na pozici 534 a tím inhibuje transkripci genů indukovanou BMAL1:CLOCK dimerem (Sanada et al., 2002). Také fosforyluje proteiny CRY1 a CRY2, negativní elementy hodinového mechanismu, na specifických serinech a tím zvyšuje jejich interakci s BMAL1:CLOCK dimerem (Sanada et al., 2004). V souladu s předchozím pozorováním dochází k inhibici transkripce hodinových genů *Cry1* a *Cry2*. Inhibice ERK1/2 významně snižuje rytmickou expresi hodinových genů a také rytmickou elektrickou aktivitu neuronů v SCN (Akashi et al., 2008). Aktivace ERK1/2 je tedy nezbytná pro udržování robustních rytmů v SCN. pERK1/2 také hraje roli ve světelné synchronizaci centrálního pacemakeru v SCN (Coogan a Piggins, 2003; Dziema et al., 2003; Obrietan et al., 1998).

2.1.4.3. Kináza glykogensyntázy 3 β

Stabilita hodinové smyčky může být modulována také kinázou glykogensyntázy 3 β (GSK3 β), jejíž fosforylace vede k její inhibici (Stambolic a Woodgett, 1994; Sutherland et al., 1993). Fosforylovaná forma GSK3 β (pGSK3 β) vykazuje v SCN v periodicky se střídajících podmínkách světla a tmy robustní cirkadiánní rytmus s maximální expresí ve druhé části noci (Iitaka et al., 2005; Pačesová et al., 2015). V podmínkách konstantní tmy dochází také k rytmické fosforylaci GSK3 β s maximem exprese v první části subjektivního dne (Besing et al., 2015), což naznačuje hodinami řízenou aktivaci GSK3 β . Inhibice/fosforylace a aktivace/defosforylace GSK3 β vedou ke změnám ve fázi, fosforylace vede k fázovému zpoždění, zatímco aktivace působí fázové předběhnutí hodin (Iitaka et al., 2005). GSK3 β moduluje hodinový mechanismus fosforylací několika klíčových proteinů transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky. Fosforylace BMAL1 prostřednictvím GSK3 β směřuje BMAL1 k ubiquitylaci a následné degradaci v proteasomu (Besing et al., 2015; Sahar et al., 2010). Nepřímo GSK3 β působí na BMAL1 prostřednictvím fosforylace REV-ERB α . Fosforylovaný REV-ERB α pak vazbou na specifickou sekvenci v promotoru inhibuje transkripci *Bmal1* (Yin et al., 2006). GSK3 β také fosforyluje proteiny CRY2 a CLOCK, což vede k jejich degradaci v proteasomu (Harada et al., 2005; Kurabayashi et al., 2010; Spengler et al., 2009), a protein PER2, který je tak snáze translokován do jádra (Iitaka et al., 2005). GSK3 β je navíc považována za spojující článek mezi elektrickou aktivitou neuronů v SCN a molekulárním mechanismem hodin (Paul et al., 2016) a také hraje roli ve světlem indukované elektrické aktivitě neuronů SCN (Paul et al., 2017). Aplikace světelného

pulsu v době subjektivní noci vede k aktivaci GSK3 β a tedy ke snížené expresi pGSK3 β v buňkách SCN (Červená et al., 2015; Paul et al., 2017). Aktivovaná GSK3 β tak může vést k fosforylaci hodinových genů zapojených v hlavním mechanismu oscilací a tím se podílet na fázových posunech rytmů.

2.2. Signální dráha JAK/STAT

JAK/STAT signální dráha je velmi významná nitrobuněčná signální dráha, která se účastní přenosu signálu od receptorů pro cytokiny a růstové faktory, přes fosforylace řady signálních molekul vedoucích v konečném důsledku až ke změně genové exprese. Tato signální dráha je evolučně konzervovaná a podobná u všech eukaryotických organismů, od hlenek až po člověka, a je zapojena v procesech jako jsou vývoj a aktivita imunitního systému, buněčné dělení, buněčná smrt či tumorigeneze (Aaronson a Horvath, 2002; Kiu a Nicholson, 2012).

2.2.1. Janus kinázy

Rodina Janus kináz (JAKs) sestává ze 4 členů (JAK1, JAK2, JAK3 a TYK2; obr. 4), které byly postupně objeveny na počátku 90. let 20. století (Kawamura et al., 1994; Wilks, 1989; Wilks et al., 1991; Witthuhn et al., 1994). JAKs obsahují 7 homologních úseků (JH1-JH7). Na C-terminálním konci leží tyrosin kinázová doména, která tvoří homologní úsek JH1 a je zodpovědná za fosforylaci substrátů. Vedle této domény se nachází pseudokinázová doména (JH2), která ji reguluje. Jelikož ve struktuře obsahují JAKs tyto dvě téměř shodné tandemové kinázové domény, jejich pojmenování pochází od římského boha Januse, který je zobrazován se dvěma tvářemi. Na N-terminálním konci se nachází FERM doména (four-point-one, ezrin, radixin, moesin doména; JH4-7), která zprostředkovává nekovalentní vazbu JAKs s cytokinovým receptorem přes strukturní motivy Box1 a Box2 a také SH2 doména (JH3-4), která je těsně spojena s FERM doménou a slouží také k vazbě s cytokinovým receptorem (Chen et al., 1997; Tanner et al., 1995).



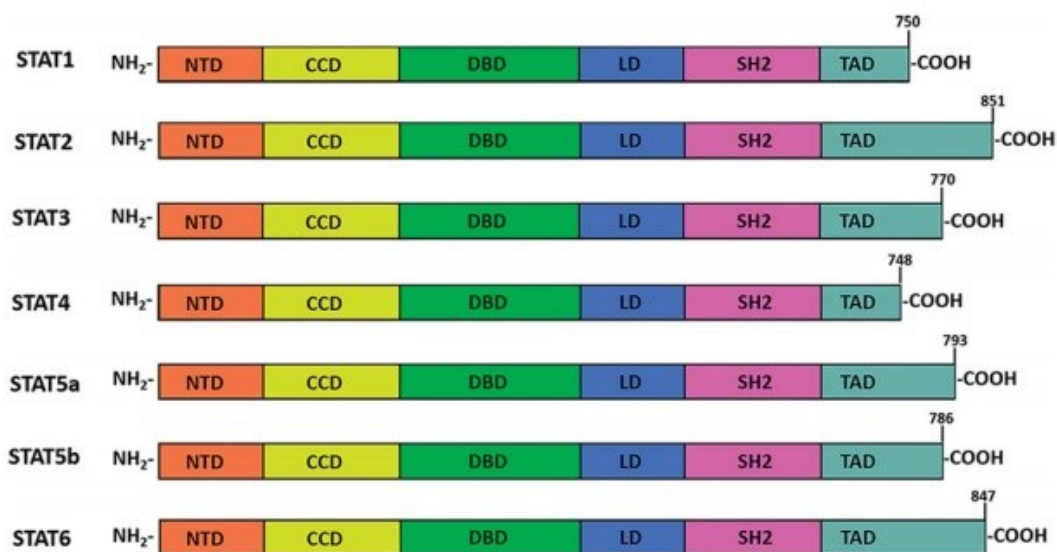
Obr. 4: Struktura Janus kináz. Všechny JAKs sdílejí sedm homologních úseků (JH1-JH7). JH1 kóduje kinázovou doménu, JH2 představuje pseudokinázovou doménu, která reguluje katalytickou aktivitu JH1. JH3 – JH7 obsahují FERM a SH2 doménu a jsou zodpovědné za interakci s receptorem. JH – homologní úseky. Převzato a upraveno podle Vainchenker et al., 2018.

2.2.2. Proteiny STAT

Rodina STAT proteinů je tvořena 7 členy (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B a STAT6), které vykazují dvojí funkci - fungují jednak jako přenašeči signálu a zároveň jako transkripční faktory.

Proteiny STAT jsou důležitými regulátory celé řady biologických procesů, včetně buněčného růstu, imunitních dějů a apoptózy. Jejich struktura je vysoce konzervovaná. Každý protein STAT se skládá z 6 domén (obr. 5). N-terminální doména je důležitá pro stabilizaci STAT dimerů, pro jejich translokaci do jádra, dále usnadňuje vazbu na DNA a následnou deaktivaci (Strehlow a Schindler, 1998; Vogt et al., 2010; Xu et al., 1996). Coiled-coil doména částečně funguje jako jaderný lokalizační signál, je zapojena v jaderném exportu a v regulaci fosforylace tyrosinu (Begitt et al., 2000; Zhang et al., 2000) a také zprostředkovává interakce s dalšími proteiny (Collum et al., 2000; Horvath et al., 1996; Zhang et al., 1999; Zhu et al., 1999). DNA vazebná doména rozpoznává a váže se na specifické sekvence DNA v promotoru cílových genů (Horvath et al., 1995). Spojovací doména propojuje DNA vazebnou doménu s SH2 doménou (Chen et al., 1998). SH2 doména rozpoznává fosforylovaný tyrosin, umožňuje spojení s cytoplasmatickou doménou příslušného receptoru, interakci s aktivujícími JAKs a homo- či heterodimerizaci proteinů STAT (Gupta et al., 1996; Shuai et al., 1994; Yan et al., 1996). Transaktivační doména obsahuje fosforylační místa a zprostředkovává aktivaci transkripce (Shuai et al., 1993; Schindler et al., 1992). Všem proteinům STAT je společný konzervovaný tyrosinový zbytek, jehož fosforylace v odpovědi na aktivaci receptoru zprostředkovává dimerizaci proteinů STAT. Pro dosažení maximálního transaktivačního

potenciálu potřebují navíc proteiny STAT1, STAT3 a STAT5 fosforylaci na serinovém zbytku C-terminální domény (Wen et al., 1995).



Obr. 5: Vysoce konzervovaná struktura proteinů z rodiny STAT. Proteiny STAT se skládají z 6 domén, N-terminální doména (NTD), která umožňuje stabilizaci STAT dimerů a jaderný import, tzv. coiled-coil doména (CCD), která interaguje s dalšími proteiny zapojenými do jaderného importu a exportu, DNA vazebná doména (DBD), která je vyžadována pro vazbu na specifické palindromatické sekvence v promotorech cílových genů, spojovací doména (LD), SH2 doména (SH2), která je vysoce konzervovaná a nutná pro rozpoznávání tyrosinové fosforylace na receptorových podjednotkách a navíc stabilizuje propojení monomerů prostřednictvím vzájemných interakcí fosfotyrosinu a SH2 a transaktivací doména (TAD) obsahuje tyrosinová a serinová fosforylační místa nezbytná pro aktivaci transkripce genů regulovaných proteiny STAT. Převzato a upraveno podle Guanizo et al., 2018.

Navzdory své vysoce konzervované struktuře každý protein STAT reaguje na odlišné extracelulární podněty a řídí odlišné buněčné procesy. Proteiny STAT1, STAT3, STAT5A a STAT5B mohou být aktivovány velkou spoustou různých, avšak často společných ligandů, zatímco proteiny STAT2, STAT4 a STAT6 aktivuje jen několik málo cytokinů. Zásadní role, kterou hrají proteiny STAT v odpovědi na cytokiny byla prokázána především pomocí modelů myších knockoutů. Myši s genetickou delecí *Stat1* a *Stat2* vykazují defekty v signální dráze, která je aktivovaná interferony a jsou snadno náchylné k virům a mikrobiálním patogenům (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996; Park et al., 2000). Pokusy se *Stat3*-deficientními myši ukázaly, že protein STAT3 je podstatný pro časný embryonální vývoj (Takeda et al., 1997). S použitím myši, kterým byl cíleně vyřazen gen *Stat4*, byl ukázán význam aktivace STAT4 prostřednictvím

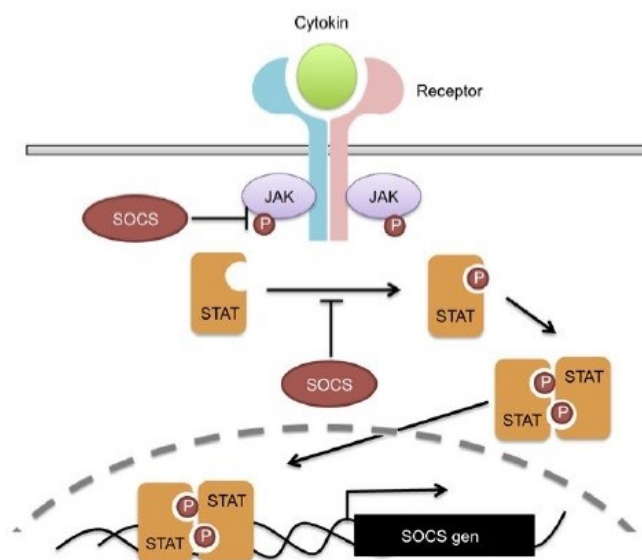
interleukinu 12 (IL-12) pro diferenciaci naivních T lymfocytů směrem k pomocným T lymfocytům Th1 (Jacobson et al., 1995; Kaplan et al., 1996a). Pro diferenciaci naivních T lymfocytů směrem k pomocným lymfocytům Th2 je naopak nezbytná aktivace proteinu STAT6 prostřednictvím IL-4 (Kaplan et al., 1996b, Takeda et al., 1996). Myši s genetickou delecí *Stat5A* mají defekty ve vývoji mléčných žláz a studium *Stat5B*-deficientních myši naznačilo roli proteinu STAT5B v sexuálním dimorfismu v rychlosti růstu (Liu et al., 1997; Udy et al., 1997). Avšak proteiny STAT5A a STAT5B hrají také roli v imunitním systému. Podílejí se například na diferenciaci regulačních T lymfocytů (Treg) a negativně regulují diferenciaci pomocných T lymfocytů Th17. Opačnou funkci v diferenciaci a regulaci Th17 a Treg plní proteiny STAT3 (Laurence et al., 2007; Wei et al., 2008; Yang et al., 2007).

Ze všech proteinů STAT je nejvíce zkoumaným STAT3 kvůli svým rozličným funkcím v mnoha buněčných procesech (Bedel et al., 2011; Sinibaldi et al., 2000; Takeda et al., 1998). Protein STAT3 byl objeven před více než 25 lety několika současně probíhajícími výzkumy jako faktor aktivovaný IL-6 (Akira et al., 1994; Lutticken et al., 1994; Standke et al., 1994; Wegenka et al., 1993; Zhong et al., 1994). V dnešní době je známo, že k jeho aktivaci dochází po vazbě mnoha cytokinů, včetně cytokinů využívajících receptor gp130, jako jsou onkostatín M, ciliární neurotrofický faktor, leukemický inhibiční faktor či IL-11 a také růstových faktorů, jako jsou epidermální růstový faktor (EGF), růstový hormon (GH), nervový růstový faktor (NGF) či z mozku odvozený neurotrofický faktor (BDNF). STAT3 může být aktivován také lipopolysacharidem (LPS; Beurel a Jope, 2009; Hosoi et al., 2004; Nakano et al., 2015; Ruff-Jamison et al., 1994; Yamawaki et al., 2010).

2.2.3. Aktivace signální dráhy JAK/STAT

Signalizace prostřednictvím JAK/STAT signální dráhy (obr. 6) je iniciována vazbou ligandu na receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. Tato vazba vede k dimerizaci a konformačním změnám v cytoplasmatické části receptoru a ke specifické vazbě JAKs, které se tak dostanou do těsné blízkosti a dochází k jejich aktivaci vzájemnou autofosforylací nebo transfosforylací. Poté, co jsou aktivovány, fosforylují JAKs specifický tyrosinový zbytek na receptoru, který pak slouží jako vazebné místo pro proteiny STAT. Po vazbě STAT prostřednictvím SH2 domény na receptor dochází k jeho fosforylaci na konzervovaném tyrosinovém zbytku pomocí JAKs. Tato fosforylace je

nezbytná pro aktivaci proteinů STAT. Aktivované proteiny STAT disociují z receptoru, vytváří homo- či hetero-dimery a translokují do jádra, kde se váží na specifické promotorové sekvence GAS (5'-TT(N₄₋₆)AA-3') na cílových genech a mohou tak ovlivňovat jejich transkripci (Aaronson a Horvath, 2002; Kisseleva et al., 2002; Kiu a Nicholson, 2012; Liongue a Ward, 2013).



Obr. 6: Zjednodušené schéma signální dráhy JAK/STAT. Po vazbě cytokinu na receptor dochází k aktivaci JAKs, které se vzájemně autofosforylují nebo transfosforylují a také fosforylují tyrosinový zbytek v intracelulární doméně receptoru. Poté dochází k navázání a aktivaci proteinů STAT, jejich dimerizaci a translokaci do jádra, kde aktivují genovou expresi, například svého regulátoru SOCS. Převzato a upraveno podle Yan et al., 2018.

Kromě výše popsané a obecně přijímané klasické aktivace JAK/STAT signální dráhy mohou proteiny STAT spouštět genovou expresi i v nefosforylovaném stavu (Chatterjee-Kishore et al., 2000; Yang et al., 2005). Také mohou tvořit rozmanité interakce s kinázou EKR1/2, s transkripčními koaktivátory CBP/p300 nebo transkripčním faktorem HSF-1 (Bhattacharya et al., 1996; Pfizner et al., 1998; Pircher et al., 1999; Schuringa et al., 2001a; Stephanou et al., 1999; Wojciak et al., 2009; Zhang et al., 1996). Nedávno byl protein STAT3 objeven také v mitochondriích, kde nevykazuje funkci transkripčního faktoru, ale podílí se na klíčových mitochondriálních procesech, jako jsou elektrontransportní řetězec a modulace mitochondriálního póru (Gough et al., 2009; Wegrzyn et al., 2009).

2.2.4. Posttranslační modifikace proteinů STAT

2.2.4.1. Fosforylace

Nejlépe popsaná posttranslační modifikace proteinů STAT3 je fosforylace tyrosinu na pozici 705 prostřednictvím JAK. Tato událost je nezbytná pro dimerizaci proteinů STAT3 a pro následnou vazbu dimerů na odpovídající vazebné místo v promotoru genů (Shuai et al., 1992).

Další z důležitých fosforylací je fosforylace serinu na pozici 727, která také přispívá k modulacím transkripční funkce proteinů STAT3. K této fosforylaci dochází aktivitou několika kináz, včetně ERK a mTOR (z angl. *mammalian target of rapamycin*; Gkouveris et al., 2014; Gough et al., 2013; Yokogami et al., 2000; Zhang et al., 1995). Fosforylace na C-koncovém serinovém zbytku proteinů STAT1, 3 a 5 je nezbytná k dosažení maximální aktivace transkripce (David et al., 1995a; Lejeune et al., 2002; Wen et al., 1995). Také v mitochondriích je aktivita STAT3 závislá na fosforylaci serinu na pozici 727 (Gough et al., 2009; Wegrzyn et al., 2009).

2.2.4.2. Acetylace

Acetylace na lysinu 685 histon acetyltransferázou p300 je považována za významnou modifikaci transaktivační funkce proteinů STAT3, která je nezbytná například pro tvorbu stabilních homodimerů STAT3 (Yuan et al., 2005). Bylo také zjištěno, že k acetylaci STAT3 na lysinu 685 může dojít po vazbě IL-6 a leukemického inhibičního faktoru a následné aktivaci signální dráhy PI3K/Akt (fosfatidylinositol-3-kináza/proteinkináza B; Ohbayashi et al., 2007). Acetylace lysinů v NTD STAT3 na pozicích 49 a 87 nastává po translokaci do jádra a vede k vytvoření dočasného komplexu fosforylovaného STAT3-p300 (pSTAT3-p300) s cílovým genem. To má za následek remodelaci chromatinu a tvorbu mezimolekulového můstku s transkripčním aparátem a dochází k aktivaci transkripce (Ray et al., 2005).

2.2.4.3. Metylace

Méně zkoumanou a velmi kontroverzní posttranslační modifikací v souvislosti s JAK/STAT signální dráhou je metylace. Bylo zjištěno, že protein STAT1 je metylován proteinovou arginin metyltransferázou PRMT-1 na N-koncovém argininu na pozici 31 a tato metylace je nezbytná, protože potlačuje interakci proteinu STAT1 s negativním regulátorem signální dráhy JAK/STAT (Mowen et al., 2001) a zdá se být klíčovou pro

defosforylaci proteinu STAT1 tyrosinfosfatázami (Zhu et al., 2002). Tento závěr byl však později zpochybněn (Komyod et al., 2005). Nicméně se dále objevují publikace zabývající se studiem metylací proteinů STAT. Iwasaki s kolegy (2010) zjistili, že metylace proteinu STAT3 právě na argininu na pozici 31 enzymem z rodiny metyltransferáz PRMT-2 se může podílet na regulaci tělesné váhy a energetického metabolismu působením v leptinové signální dráze. STAT6 obsahuje konzervovaný arginin na pozici 27 a metylace je klíčová modifikace pro funkci proteinu STAT6, pro jeho optimální fosforylaci, jadernou translokaci a vazbu na odpovídající promotorovou sekvenci (Chen et al., 2004).

2.2.5. Negativní regulace signální dráhy JAK/STAT

Aktivace signální dráhy JAK/STAT je velmi rychlá, avšak pouze přechodná. Inaktivace této dráhy bývá zprostředkována různými mechanismy a je nezbytná pro zajištění vhodné buněčné odpovědi v reakci na cytokiny. Nekontrolovaný přenos signálu od cytokinů by mohl vést k rozvoji různých onemocnění. Inaktivace cytokinové signální dráhy nastává na různých úrovních, od receptorů k transkripčním faktorům.

2.2.5.1. Supresory cytokinové signalizace

Supresory cytokinové signalizace (SOCS) jsou jedním z klíčových mechanismů regulace signální dráhy JAK/STAT. Dosud bylo identifikováno 8 členů z rodiny proteinů SOCS (SOCS1-SOCS7, CIS; Hilton et al., 1998). Negativní zpětnovazebný mechanismus regulace spočívá v indukci genové exprese *SOCS* aktivovanými proteiny STAT. Vzniklé proteiny SOCS regulují signální dráhu JAK/STAT odlišnými mechanismy. SOCS1 obsahují SH2 doménu, která jim umožňuje vazbu přímo na aktivní JAK, což vede k inhibici její aktivity (obr. 6; Endo et al., 1997; Naka et al., 1997; Starr et al., 1997). SOCS3 inhibují aktivitu JAKs současnou vazbou SH2 domény na cytokinový receptor a JAK (Nicholson et al., 1999; Sasaki et al., 2000). CIS, na rozdíl od ostatních členů proteinů rodiny SOCS, inhibují signální dráhu JAK/STAT kompeticí s proteiny STAT o vazebné místo na receptoru (Yoshimura et al., 1995).

2.2.5.2. Proteiny inhibující aktivovaný STAT

Druhou skupinou negativních regulátorů signální dráhy JAK/STAT jsou proteiny inhibující aktivovaný STAT (PIAS). Do rodiny proteinů PIAS jsou řazeny 4 členy (PIAS1, PIAS3, PIASx a PIASy), které zabraňují proteinům STAT translokovaným

v jádře nasednout na DNA a spouštět genovou expresi. Na rozdíl od proteinů SOCS jsou proteiny PIAS v buňkách konstitutivně exprimované. Ačkoliv přesný mechanismus regulace proteinů STAT prostřednictvím PIAS není zcela znám, je zřejmé, že proteiny PIAS vyžadují pro svou interakci s proteiny STAT jejich fosforylaci na tyrosinu (Liu et al., 1998). Navíc bylo zjištěno, že PIAS1 preferenčně interaguje s nemetylovaným proteinem STAT1 (Mowen et al., 2001). PIAS inhibují interakci s proteiny STAT genovou expresi, avšak rozdílným mechanismem. PIAS1 a PIAS3 specificky regulují genovou expresi indukovanou proteiny STAT, a to inhibicí DNA vazebné aktivity proteinů STAT1 a STAT3 (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998). Mechanismus, kterým inhibují PIASx a PIASy signální dráhu JAK/STAT není dosud plně objasněn. PIASx a PIASy pravděpodobně neovlivňují DNA vazebnou aktivitu proteinů STAT, ale fungují jako korepresory, které umožňují vazbu dalších molekul (například deacetyláz histonů) a tím inhibují aktivitu STAT4 a STAT1 (Arora et al., 2003; Liu et al., 2001). Také bylo zjištěno, že se PIAS účastní sumoylace STAT1 proteinů, což může hrát také roli v regulaci genové exprese závislé na aktivovaných STAT (Ungureanu et al., 2005).

2.2.5.3. Proteinové tyrosinfosfatázy

Jelikož fosforylace je nejdůležitějším a klíčovým jevem v aktivaci signální dráhy JAK/STAT, třetí skupinou negativních regulátorů této dráhy jsou proteinové tyrosinfosfatázy (PTP). Tato skupina je tvořena několika odlišnými proteiny, které defosforylují tyrosinové zbytky na receptorech, JAKs a proteinech STAT. Mezi hlavní PTP patří SHP-1, SHP-2 a CD45. SHP-1 inhibuje působení různých cytokinů a ligandů cytokinových receptorů, interaguje prostřednictvím SH2 domény s aktivovaným receptorem a defosforyluje receptor a další substráty, například JAK1 a/nebo JAK2 (David et al., 1995b; Klingmüller et al., 1995; Yi et al., 1993). Mutace receptoru znemožňuje interakci s SHP-1 a vede k prodloužené aktivitě JAK2 a celé signální dráhy (Klingmüller et al., 1995). SHP-2 působí pravděpodobně podobným mechanismem. Mutace receptoru také zabraňuje vazbu SHP-2 k receptoru a vede k prodloužené aktivaci proteinu STAT3 (Ohtani et al., 2000). SHP-2 také pravděpodobně přímo defosforyluje proteiny STAT5 v cytosolu (Yu et al., 2000). Membránově vázaná fosfatáza CD45 přímo interaguje s JAK2, defosforyluje ji a tím negativně reguluje signální dráhu vedoucí od cytokinů (Irie-Sasaki et al., 2001).

2.2.5.4. Proteasomální degradace

V regulaci signální dráhy zprostředkované cytokiny hraje roli také degradace proteinů konjugovaných s ubiquitinem v proteasomu. Degradace v proteasomu byla pozorovaná v souvislosti s JAKs, ale také s proteiny STAT. Polyubiquitinace fosforylované JAK2 vede k její následné degradaci (Ungureanu et al., 2002), stejně jako například polyubiquitinace proteinů STAT1 a/nebo STAT3 (Kim a Maniatis, 1996; Wei et al., 2012), což přispívá k udržení rovnováhy v signální dráze zprostředkované cytokiny.

2.3. Role proteinů STAT3 a STAT5 v cirkadiálním systému

Jakou úlohu hrají proteiny STAT v cirkadiálním systému není dosud známo. V posledním desetiletí se však objevuje několik málo prací, které se zaměřují na zapojení proteinů STAT3 a STAT5 v regulaci hlavního mechanismu cirkadiálních oscilací, a to v souvislosti s různými onemocněními. Bylo zjištěno, že se tyto proteiny mohou buď přímo vázat do promotorů hodinových genů, nebo mohou zprostředkovaně aktivací jiných signálních molekul modulovat expresi hodinových genů. Jedním z příkladů je zapojení STAT3 ve vlivu střevní mikrobioty na metabolismus lipidů. Střevní mikrobiota aktivuje buňky imunitního systému, což vede v důsledku k fosforylaci proteinu STAT3. pSTAT3 ani mRNA sice nevykazují v epiteliálních buňkách střeva cirkadiální rytmus, avšak pSTAT3 se přímo váže do promotoru *Rev-erba* a inhibuje jeho transkripci. Inhibice transkripce *Rev-erba* má vliv na metabolismus lipidů a může vést k obezitě a dalším metabolickým chorobám (Wang et al., 2017). pSTAT3 se dále může, aktivací malé nekódující RNA označené miR-7-5p, podílet na diferenciaci osteoblastů a tvorbě kostí a být tak možným terapeutickým cílem při léčbě osteoporózy. Tato miRNA se následně váže do 3' nepřekládaného úseku hodinového genu *Cry2* a tím inhibuje jeho expresi a následnou translaci, což má za následek aktivaci heterodimeru CLOCK:BMAL1. Tento heterodimer pak aktivuje transkripci genů zodpovědných za diferenciaci osteoblastů (Tang et al., 2020). Další zapojení proteinu STAT3 v regulaci exprese hodinových genů bylo objeveno v souvislosti s oxidativním stresem, který doprovází mnoho chorob. Peroxid vodíku, jeden z významných mediátorů oxidativního stresu, oxiduje peroxiredoxín 2, a, zatím neznámým mechanismem, zvyšuje expresi proteinu STAT3. STAT3 pak vazbou do promotoru *Rev-erba/β* moduluje expresi hodinových genů, především BMAL1 a CLOCK (Ji et al., 2019).

Interakce proteinu STAT5B s hodinovým mechanismem byla pozorována v souvislosti s poruchami růstu. STAT5B bývá aktivovaný vazbou GH na svůj specifický receptor (GHR), což vede následně k aktivaci JAK2. Fosforylovaný STAT5B (pSTAT5B) indukuje transkripci genu pro inzulinu podobný růstový faktor (*Igf-1*). IGF-1 vykazuje v plasmě denní rytmus, který je však významně redukován u myši s genovou delecí *Cry1*, 2. Podobně je také u těchto myši snížena mRNA exprese *Igf-1* a hladina pSTAT5B. Současně však nedochází k významným změnám v hladinách aktivované JAK2. CRY se tedy jeví jako spojovací článek cirkadiálního molekulárního mechanismu a signální dráhy JAK/STAT, neboť prostřednictvím regulace fosforylace proteinu STAT5B reguluje tvorbu IGF-1 (Chaudhari et al., 2017).

Výše zmíněné studie se však zabývají pouze proteiny STAT3 a STAT5 v interakci s hodinovými geny v různých buněčných liniích nebo periferních tkáních. V SCN však úloha proteinů STAT3 nebyla dosud studována. Protein STAT3 se studuje především ve spojitosti s imunitním systémem. Z toho důvodu je možné usuzovat na jeho možnou roli v SCN v interakci cirkadiálního s imunitním systémem.

2.4. Interakce imunitního a cirkadiálního systému

Doposud bylo publikováno značné množství prací týkajících se regulace imunitních funkcí cirkadiálním systémem. Cirkadiální exprese hodinových genů byla objevena jak v primárních, tak sekundárních lymfatických orgánech imunitního systému. V kostní dřeni, primárním lymfatickém orgánu, mohou být rytmicky exprimované hodinové geny zodpovědné za cirkadiální změny v hematopoéze (Chen et al., 2000). Ve slezině a mizních uzlinách, sekundárních lymfatických orgánech, může mít rytmická exprese hodinových genů vliv například na tvorbu cytokinů či proliferaci T lymfocytů (Fortier et al., 2011; Keller et al., 2009). Také v samotných buňkách imunitního systému byly objeveny hodinové geny, jejichž rytmická exprese se podílí na cirkadiálním řízení různých imunitních funkcí. V makrofázích je například hodinovým mechanismem řízena fagocytóza a uvolňování různých cytokinů (Hayashi et al., 2007). V NK buňkách je uvolňování cytokinů a cytotoxických látek také pod kontrolou molekulárního mechanismu (Arjona a Sarkar, 2005). Podobně také v žírných buňkách a eozinofilních granulocytech, které se podílejí na zánětlivých onemocněních, jako je například astma bronchiale, byly nalezeny hodinové geny, díky nimž jsou jejich mediátory rytmicky uvolňovány (Baumann et al., 2013; Wang et al., 2011). Cirkadiální exprese hodinových

genů je také pozorována v dendritických buňkách a B lymfocytech (Silver et al., 2012). Byly popsány změny v počtu buněk nespecifického, ale také specifického imunitního systému v krvi v závislosti na denní době. Počet buněk nespecifické imunitní odpovědi, NK buněk a neutrofilních granulocytů, je u lidí nejvyšší ve dne (Ackermann et al., 2012; Born et al., 1997). U nočních hlodavců je počet NK buněk nejvyšší na konci noci, zatímco hladiny neutrofilních granulocytů a monocytů jsou nejvyšší v době dne (Hriscu, 2005; Pelegrí et al., 2003; Oishi et al., 2006). Vyšší počty buněk specifické imunitní odpovědi, T a B lymfocytů, se nacházejí v krvi v době odpočinku, u lidí v době noci (Ackermann et al., 2012; Born et al., 1997), u nočních hlodavců naopak především ve dne (Pelegrí et al., 2003; Oishi et al., 2006). Z výše uvedeného je patrné, že cirkadiánní řízení imunitních funkcí je velmi dobře prozkoumáno. V současné době se předpokládá, že imunitní systém také zpětně působí na systém cirkadiánní. Avšak informace týkající se toho, zda a jakým způsobem imunitní systém reguluje cirkadiánní hodiny, nejsou téměř známy. V posledních několika letech se objevují poznatky, že neuroinflamace vede k desynchronizaci v SCN, v dalších podřízených oscilátorech v mozku a také v periferních orgánech (Guissoni Campos et al., 2017; Okada et al., 2008; Yamamura et al., 2010). Tato desynchronizace je pozorována především změnami na behaviorální úrovni, projevuje se například změnami v denních rytmech v náladě, poruchami spánku, poruchami v sekreci hormonů, změnami v termoregulaci a poruchami v lokomoční aktivitě (Guan et al., 2015; Marpegán et al., 2005; Prendergast et al., 2015). Současný výzkum se zaměřuje právě na reciproční vztah mezi imunitním a cirkadiánním systémem a snaží se nalézt molekuly, které jsou zodpovědné za změny na molekulární úrovni.

2.5. Role LPS v cirkadiánním systému a vliv na signální dráhu JAK/STAT

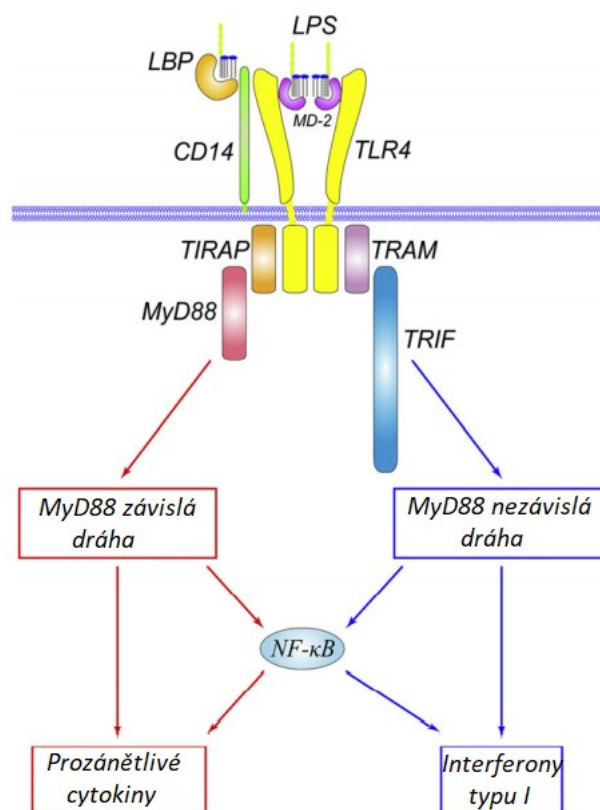
2.5.1. LPS jako ligand Toll-like receptorů

LPS, hlavní a esenciální komponenta vnější membrány gramnegativních bakterií, je významný endotoxin působící jako silný aktivátor přirozené imunity u všech eukaryotních organismů. V závislosti na dávce vykazuje v organismu rozdílné účinky. Zatímco nízké dávky LPS vyvolávají zánět jako ochrannou imunitní reakci proti bakteriální infekci, vysoké dávky LPS vedou ke vzniku různých onemocnění, k rozvoji septického šoku, multiorgánového selhání a mohou mít dokonce letální charakter (Opal, 2010). LPS je ligandem receptorů z rodiny Toll-like (TLR), která u savců zahrnuje

celkem 11 členů (TLR1-TLR11), avšak konkrétně TLR4 rozpoznává LPS a spouští tvorbu zánětlivých cytokinů (Poltorak et al., 1998).

2.5.1.1. Signalizace TLR4

Signální dráha TLR4 je iniciována vazbou LPS na sérový lipopolysacharid vázící protein (LBP; Tobias et al., 1986; Tobias et al., 1989). LPS je v tomto komplexu přenesen na membránově kotvenou pomocnou molekulu CD14, která usnadňuje interakci LPS s TLR4 (Wright et al., 1990). TLR4 se nachází v komplexu s myeloidním diferenciačním proteinem 2 (MD-2; Shimazu et al., 1999) a po vazbě LPS dochází k dimerizaci komplexu TLR4:MD-2 (Saitoh et al., 2004). Dimerizace TLR4:MD-2 komplexu a tím aktivace TLR4 signální dráhy má za následek vazbu adaptorových molekul a vede k tvorbě prozánětlivých cytokinů a interferonů indukci dvou rozdílných signalizačních drah, dráhy závislé na myeloidním diferenciačním faktoru 88 (MyD88 závislá dráha; Kawai et al., 1999) a dráhy nezávislé na MyD88 (MyD88 nezávislá dráha; Yamamoto et al., 2002; obr. 7). Aktivace MyD88 závislé dráhy je zahájena vazbou adaptorových molekul TIRAP (z angl. *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*) obsahujících Toll/interleukin 1 receptorovou (TIR) doménu na intracelulární doménu TLR4 (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001; Núñez Miguel et al., 2007) a faktoru MyD88 (Kagan a Medzhitov, 2006), který následně vede k aktivaci MAPK signálních drah a jaderného faktoru kappa B (NF-κB). Transkripční faktor NF-κB translokuje do jádra, kde vazbou do promotorů iniciuje genovou expresi prozánětlivých cytokinů, například TNF-α (Kawai et al., 1999). MyD88 nezávislá dráha je aktivována vazbou adaptorových molekul TRAM (z angl. *TRIF-related adaptor molecule*) na intracelulární doménu TLR4 (Núñez Miguel et al., 2007), a tato vazba dále vede k vazbě adaptorového proteinu TRIF (z angl. *TIR domain-containing adaptor inducing interferon beta*; Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). TRIF aktivuje regulační faktor pro interferon 3 (IRF3), který translokuje do jádra, kde iniciuje transkripci interferonu beta (IFNβ; Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2002; Yamamoto et al., 2003).



Obr. 7: Zjednodušené schéma signální dráhy zprostředkované bakteriálním LPS. LPS je rozpoznán lipopolysacharid vázajícím proteinem (LBP) a pomocnou molekulou CD14, které usnadňují vazbu LPS na komplex TLR4 s myeloidním diferenciačním proteinem 2 (MD-2). Vazba LPS na tento komplex vede k dimerizaci TLR4:MD-2 komplexu a vazbě adaptorových molekul (TIRAP, TRAM, MyD88 a TRIF). Podle vazby adaptorových molekul se TLR4 signální dráha dělí na MyD88 závislou a MyD88 nezávislou. Aktivaci MyD88 závislé a MyD88 nezávislé dráhy dochází k tvorbě prozánětlivých cytokinů (například TNF- α) a interferonů typu I (například IFN β). Převzato a upraveno podle Lu et al., 2008.

2.5.2. Působení LPS na cirkadiánní systém

Ještě před objevením hlavního cirkadiánního pacemakeru v SCN byly provedeny některé pionýrské studie, které poukazovaly na změnu v citlivosti k letální dávce LPS v závislosti na denní době jejího podání (Halberg et al., 1960). Tento efekt byl později rozšířen a připisován k nadměrné produkci prozánětlivých cytokinů u pokusných hlodavců v určitou denní dobu (Marpegán et al., 2009). Mechanismus, jakým LPS moduluje cirkadiánní systém a expresi hodinových genů není dosud známý. Avšak předpokládá se, že by mohlo jít právě o nepřímé působení prostřednictvím prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6, TNF- α a/nebo IFN γ . Okada s kolegy (2008) zjistili, že intravenózní injekce LPS na začátku klidové fáze (ZT1; zeitgeber time) potkanům v dávce 1 mg/kg zvyšuje hladinu TNF- α a IL-6 v plasmě. Hladina TNF- α se významně

zvyšuje již hodinu po podání LPS, oproti tomu hladina IL-6 vykazuje nejvyšší hodnotu až o 4 hodiny později oproti TNF- α . V jiné studii byl intravenózně aplikován LPS v dávce 100 $\mu\text{g/kg}$ a 1,6 $\mu\text{g/kg}$ potkanům ve dvou denních dobách, na začátku odpočinku (ZT2) a na začátku aktivity (ZT14). Ukázalo se, že tvorba prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 po aplikaci LPS během aktivní fáze zvířete je 2krát vyšší než ve fázi klidové. Během aktivní fáze má organismus větší šanci setkat se s patogenem, proto je také aktivita imunitního systému vyšší. Navíc u potkanů, kterým byla odstraněna SCN, měla aplikace LPS za následek až 10násobný nárůst v plasmatické hladině IL-6 a TNF- α již 80 minut od aplikace LPS oproti potkanům, kterým SCN odstraněna nebyla (Guerrero-Vargas et al., 2014). Léze SCN tak může vést k abnormální odpovědi imunitního systému. LPS aplikovaný v dávce 12,5 mg/kg myším s desynchronizovaným cirkadiánním systémem po vystavení chronickému jet lagu, vede k vyššímu uvolňování prozánětlivých cytokinů a k vyšší mortalitě myši (Castanon-Cervantes et al., 2010). Dále je známo, že u potkanů, kterým byl podán LPS v dávce 1 mg/kg dochází k signifikantnímu nárůstu v koncentraci prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-1 β v plasmě oproti zvířatům, kterým byl podán LPS v nižší koncentraci (5 $\mu\text{g/kg}$ nebo 25 $\mu\text{g/kg}$; Givalois et al., 1994). Tyto výsledky naznačují, že tvorba prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α je po aplikaci nízkých, ale také vysokých dávek LPS pod cirkadiánní kontrolou a uvolňování prozánětlivých cytokinů závisí na době aplikace LPS.

V současnosti je známo několik prací zabývajících se studiem účinků LPS na cirkadiánní systém nejen na úrovni behaviorální, ale také na úrovni molekulární, a to jak v centrálním pacemakeru, tak také v periferních oscilátorech (Marpegán et al., 2005; Okada et al., 2008; Yamamura et al., 2010).

2.5.2.1. Změny v chování a fyziologii vlivem LPS

Změny rytmů na behaviorální úrovni jsou nejčastěji sledovány jako změny v lokomoční aktivitě nebo také v tělesné teplotě. LPS aplikovaný na začátku klidové fáze (ZT1) v dávce 1 mg/kg významně snižuje lokomoční aktivitu potkanů první a druhý den po aplikaci LPS. K návratu na původní aktivitu dochází třetí den od aplikace LPS (Okada et al., 2008). Myši, kterým byl LPS podán v dávce 5 mg/kg mezi ZT6 a ZT8 nevykazují žádnou aktivitu na běhacím kolečku po 2-4 dny od aplikace LPS (O'Callaghan et al., 2012). Injekčně aplikovaný LPS v dávce 25 $\mu\text{g/kg}$ a/nebo 50 $\mu\text{g/kg}$ v časně subjektivní noci (CT15; cirkadiánní čas) způsobuje fázové zpoždění v lokomoční aktivitě (Marpegán

et al., 2005; Paladino et al., 2010) a tento fázový posun je podobný světlem indukovanému fázovému zpoždění, což naznačuje, že aktivace imunitního systému je synchronizačním signálem pro biologické hodiny u myší.

LPS kromě účinků na lokomoční aktivitu také působí na tělesnou teplotu. Aplikace LPS v dávce 100 µg/kg potkanům na začátku odpočinku (ZT2) vyvolá hypertermii s významným vzrůstem tělesné teploty o 0,8 °C 6 hodin po aplikaci LPS, zatímco při aplikaci LPS na počátku aktivní fáze (ZT14) je pozorována hypotermie, přičemž signifikantní snížení tělesné teploty o 1,32 °C oproti kontrole je pozorováno 3 hodiny od aplikace LPS (Guerrero-Vargas et al., 2014). Aplikace LPS na začátku subjektivní noci myším v dávce 25 µg/kg nevyvolává žádné změny v tělesné teplotě (Marpegán et al., 2005). Naproti tomu, aplikace velmi nízké dávky LPS (1,6 µg/kg) zvířatům bez SCN vede k počátečnímu nárůstu tělesné teploty po 1 hodině od aplikace, avšak hlavní efekt LPS je pozorován po 7 hodinách od aplikace, kdy dochází k hypertermii potkanů se zvýšením tělesné teploty o 1,06 °C oproti bazální hladině (Guerrero-Vargas et al., 2014). Vyšší dávka LPS (250 µg/kg) podaná myším na počátku subjektivní noci (CT15) snižuje tělesnou teplotu o 3 °C již 1 hodinu po aplikaci a tento efekt přetrvává zhruba po 4 hodiny (Marpegán et al., 2005).

2.5.2.2. Změny v SCN vlivem LPS

2.5.2.2.1. Změny v hladinách a expresi hodinových genů v SCN

Takahashi s kolegy (2001) se jako první zabývali studiem vlivu LPS na expresi hodinových genů v SCN. V jejich experimentálních podmínkách injekčně podaný LPS v dávce 50 µg/kg myším na konci aktivní fáze (ZT22) neměl významný vliv na expresi hodinových genů *Per1* a *Per2* v SCN 1, 3 a 24 hodin od aplikace LPS. Po tomto prvotním experimentu následovaly další studie. Okada se spolupracovníky (2008) jako první prokázali, že systémová aplikace LPS potkanům na začátku klidové fáze (ZT1) v dávce 1 mg/kg mění expresi hodinových genů v průběhu 24hodinového cyklu v hlavním oscilátoru v SCN. Injekčně aplikovaný LPS významně snižuje expresi hodinového genu *Per2* a hodinami kontrolovaného genu *Dbp* v SCN první den po aplikaci LPS. Toto snížení je však přechodné a obnovení původní exprese nastává již druhý den od podání LPS. LPS navíc posouvá vrchol v expresi *Per2* a *Dbp* mRNA o 8 hodin, z původní maximální exprese *Per2* v ZT6 na ZT14 a pro *Dbp* z ZT10 na ZT18. Kromě účinků LPS na expresi hodinových genů byl pozorován také vliv na hladinu proteinů PER1 a PER2 v

SCN. Intraventrikulárně podaný LPS v dávce 3 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ zvyšuje hladinu proteinu PER1 v ZT15 a snižuje hladinu tohoto proteinu v ZT5 a ZT20. Hladina proteinu PER2 je po aplikaci LPS snížena v ZT5, ZT10 a ZT15 (Guissoni Campos et al., 2017). Z těchto experimentů vyplývá, že LPS tedy může ovlivňovat přímo hlavní komponenty hodinového mechanismu v SCN.

2.5.2.2.2. Změny v aktivitě neuronů SCN

Je známo, že hladina okamžitého časného genu c-Fos v SCN osciluje v průběhu 24hodinového cyklu s vyššími hodnotami během dne a nižšími hodnotami během noci. c-Fos bývá používán jako marker aktivity neuronů a jeho indukce nastává v SCN ihned po světelném pulsu v době subjektivní noci (Aronin et al., 1990; Kornhauser et al., 1990). Po noční aplikaci LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ZT14) je také pozorovaná zvýšená hladina c-Fos v SCN potkana, a to především ve vlSCN (Guerrero-Vargas et al., 2014). Tato oblast SCN hraje důležitou roli při vstupu a přenosu informace o světle, což naznačuje, že systémová aplikace LPS může mimikovat vstup světla do SCN. V jiné práci byla však pozorovaná indukce c-Fos po aplikaci 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS v CT15 spíše v dorsální části SCN (Marpegán et al., 2005). dmSCN má důležitou úlohu v synchronizaci nesvětelnými podněty a může být potenciálním místem pro interakce cirkadiálního a imunitního systému.

Nekonzistentní data ve výše zmíněných studiích mohou být způsobena a vysvětlena použitím nestejné dávky endotoxinu, rozdílného modelového organismu a různým nastavením experimentálního paradigmatu.

2.5.3. Vliv LPS na signální dráhu JAK/STAT

Jak bylo popsáno výše, po vazbě LPS na TLR4 dochází k aktivaci transkripčního faktoru NF- κB a k iniciaci transkripce prozánětlivých cytokinů. Cytokiny poté vazbou na své odpovídající receptory mohou aktivovat signální dráhu JAK/STAT. Transkripční faktor NF- κB byl objeven také v SCN hlodavců (Leone et al., 2006; Marpegán et al., 2004) a to především v astrocytech a k jeho aktivaci dochází jak prostřednictvím LPS, tak také prozánětlivými cytokiny TNF- α a IL-1 α (Leone et al., 2006; O'Keeffe et al., 2017). Je dobře známo, že astrocyty mají schopnost reagovat na mnoho cytokinů, jako jsou například IL-6, IL-12, TNF- α nebo IFN γ . Kromě toho jsou také schopny různorodé cytokiny (např. IL-1 β , TNF- α , IL-6) a chemokiny (např. CCL2, CXCL1, CXCL10, CXCL12) produkovat (Benveniste, 1997; Lieberman et al., 1989; McKimmie a Graham,

2010). Astrocytům SCN je v posledních letech věnována větší pozornost především v souvislosti interakce imunitního s cirkadiánním systémem. Nejen že exprimují hodinové geny a podílí se na tvorbě a udržování cirkadiánních rytmů (Brancaccio et al., 2017; Prolo et al., 2005), ale také mohou být považovány za propojující článek mezi imunitním a cirkadiánním systémem (Leone et al., 2006; Duhart et al., 2013). Je známo, že LPS moduluje cirkadiánní hodiny v SCN prostřednictvím TLR4 (Paladino et al., 2010) a že do signální dráhy působení LPS v SCN může být zapojen cytokin TNF- α a jeho receptor TNFR (Leone et al., 2012; Paladino et al., 2014) a také chemokin CCL2 (Duhart et al., 2016). Byl navržen mechanismus, jakým astrocyty SCN moduluji cirkadiánní hodiny v reakci na stimulaci imunitního systému. Zánětlivá stimulace pravděpodobně vede k indukci TNF- α , který vazbou na TNFR astrocytů SCN může měnit fázi a amplitudu v rytmickém uvolňování hodinového genu *Per2* a také indukuje uvolňování TNF- α a dalších cytokinů, jako jsou například IL-6 a CCL2. Cytokiny uvolněné z astrocytů SCN pak mohou aktivovat neurony SCN, indukovat v nich expresi hodinových genů a mohou modulovat výstupní rytmy a posouvat rytmy v lokomoční aktivitě (Duhart et al., 2013). Jaké další molekuly se účastní interakce cirkadiánního s imunitním systémem, není dosud objasněno.

Úloha proteinu STAT3 v SCN není dosud studována. Aktivace a následná jaderná translokace STAT3 byla pozorována v hypotalamu po aplikaci LPS (Hosoi et al., 2004) a to především v astrocytech (Gautron et al., 2002). LPS pravděpodobně aktivuje expresi genu pro cytokin IL-6 a ten pak aktivuje signální dráhu JAK/STAT (Harré et al., 2002). Dále bylo zjištěno, že aplikace cytokinu IFN- α snižuje expresi a hladinu hodinových genů CLOCK a BMAL1 v SCN, pravděpodobně mechanismem závislým na signální dráze JAK/STAT (Koyanagi a Ohdo, 2002). STAT3 aktivovaný v astrocytech periferní aplikací LPS může posilovat expresi genů zapojených v odpovědi mozku na zánět a být tak molekulou zprostředkující informace o zánětu SCN.

3. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo definovat regulaci genové exprese a proteinové fosforylace transkripčních faktorů rodiny STAT v SCN potkana. Je známo, že proteiny STAT jsou často exprimované v astrocytech. Proto jsme se zaměřili na identifikaci buněčných typů exprimujících protein STAT3, jeho fosforylované formy na tyrosinu a serinu (pSTAT3(Y) a pSTAT3(S)), proteiny STAT5A a STAT5B v SCN. Dále jsme se zabývali studiem interakce cirkadiálního a imunitního systému. Sledovali jsme vliv endotoxinu LPS, který je považován za jeden z nejúčinnějších aktivátorů imunitního systému, na hladinu a expresi vybraných členů hodinového mechanismu a signální dráhy JAK/STAT v SCN potkana.

3.1. Přehled specifických cílů

Cíl 1: Sledování hladin proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B, jejich lokalizace v buněčných typech SCN potkana a stanovení rytmické exprese mRNA *Stat3*

- 1) Stanovení denního rytmu proteinu STAT3, jeho fosforylovaných forem a proteinů STAT5A a STAT5B
- 2) Stanovení denního rytmu v expresi *Stat3*
- 3) Identifikace buněčných typů exprimujících protein STAT3 a proteiny STAT5A a STAT5B

Cíl 2: Zkoumání účinku LPS na behaviorální rytmy u potkana, na změny v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* a v hladinách pERK1/2 a pGSK3β, v expresi *Stat3* a hladinách fosforylovaných forem proteinu STAT3 v závislosti na čase aplikace

- 1) Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na lokomoční aktivitu potkana
- 2) Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba*
- 3) Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni hladiny proteinů pERK1/2 a pGSK3β
- 4) Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese *Stat3*
- 5) Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na hladiny fosforylovaných forem proteinu STAT3

4. Seznam vlastních publikací

4.1. Seznam použitých publikací

- 1) Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z. 2016. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*; 94:1; 99-108. (IF = 4,139)
- 2) Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., Bendová, Z. 2018. The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLOS One*; 13:9; 1-16. (IF = 2,776)

4.2. Seznam ostatních publikací

- 3) Kubová, H., Bendová, Z., Moravcová, S., Pačesová, D., Rocha, L. L., Mareš, P. 2018. Neonatal clonazepam administration induces long-lasting changes in glutamate receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience*; 11:382; 1-12. (IF = 3,720)
- 4) Bendová, Z., Moravcová, S. 2018. Erasing day/night differences in light intensity and spectrum affect biodiversity and the health of mammals by confusing the circadian clock. *Lynx, n. s.*; 49:1; 139-161. (recenzované neimpaktované periodikum vydávané v České republice)
- 5) Filipovská, E., Červená, K., Moravcová, S., Novotný, J., Kyclerová, H., Spišská, V., Pačesová, D., Bendová, Z. 2019. The effect of the cannabinoid receptor agonist and antagonist on the light-induced changes in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Neuroscience Letters*; 703; 49-52. (IF = 2,173)
- 6) Pačesová, D., Moravcová, S., Kopřivová, J., Bendová, Z. 2019. Circadian system disturbances in Huntington's disease – implications for light therapy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*; 115:3; 289-294. (IF = 0,355)
- 7) Kubová, H., Bendová, Z., Moravcová, S., Pačesová, D., Rocha, L. L., Mareš, P. 2020. Neonatal clonazepam administration induces long-lasting changes in GABA_A and GABA_B receptors. *International Journal of Molecular Sciences*; 21:9; 1-20. (IF = 4,183)

- 8) Moravcová, S., Červená, K., Míková, H., Pačesová, D., Pallag, G., Novotný, J., Bendová, Z. 2020. Social defeat stress affects resident's clock gene and *Bdnf* expression in the brain. *Stress*; 1-7. (IF = 2,168)
- 9) Kubištová, A., Spišská, V., Petrželková, L., Hrubcová, L., Moravcová, S., Maierová, L., Bendová, Z. 2020. Constant light in critical postnatal days affects circadian rhythms in locomotion and gene expression in the suprachiasmatic nucleus, retina, and pineal gland later in life. *Biomedicines*; 8:12; 1-20. (IF = 4,717)

4.3. Podíl na použitých publikacích

- 1) Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z. 2016. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*; 94:1; 99-108.

Podílela jsem se na práci s experimentálními zvířaty, provedla jsem imunohistochemická stanovení zkoumaných proteinů a podílela se na počítání imunopozitivních buněk a statistické analýze dat.

- 2) Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., Bendová, Z. 2018. The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLOS One*; 13:9; 1-16.

Podílela jsem se na práci s experimentálními zvířaty, provedla jsem laserovou mikrodisekci, izolaci RNA a Real-time PCR, imunohistochemická stanovení zkoumaných proteinů, podílela jsem se na in situ hybridizaci a analýze dat a editovala prvotní manuskript.

Předkládané publikace, na kterých je založena tato disertační práce, jsou výsledkem spolupráce několika vědeckých pracovníků. Autorka disertační práce se na těchto publikacích podílela a její příspěvek je výše rozepsán. Spoluautoři jsou s tím seznámeni a souhlasí.

Tímto potvrzuji, že údaje o podílu Mgr. Simony Moravcové na vzniku předložených publikací odpovídají skutečnosti.

V Praze dne

doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

5. Seznam metod

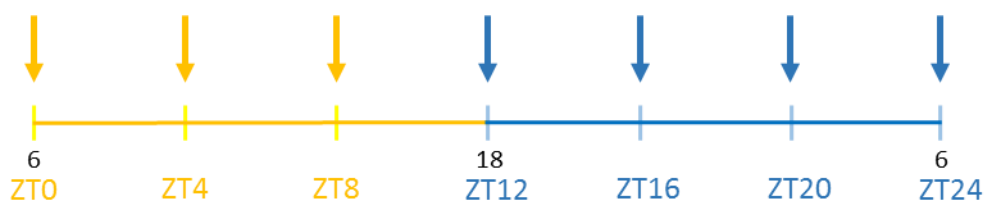
5.1. Laboratorní zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (Velaz s.r.o., Koleč, Česká republika) s přibližnou hmotností 300 gramů. Potkani byli 14 dní před experimentem chováni na světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (LD 12:12, z angl. light-dark). Světlo se rozsvěcelo v 6 hodin ráno a zhasínalo v 18 hodin večer pomocí automatických spínacích hodin. Experimentální zvířata byla chována při teplotě 23 ± 2 °C, byla krmena standardní chovnou dietou (ST-1) a měla po celou dobu experimentu neomezený (*ad libitum*) přístup k potravě i vodě. Všechny experimenty byly provedeny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (licence No. MSMT-23852/2014-14) a s Vyhláškou o ochraně pokusných zvířat.

5.2. Experimentální paradigma

5.2.1. Denní profil hladiny proteinu STAT3, jeho fosforylovaných forem a proteinů STAT5A a STAT5B a lokalizace STAT3, STAT5A a STAT5B v buněčných typech SCN

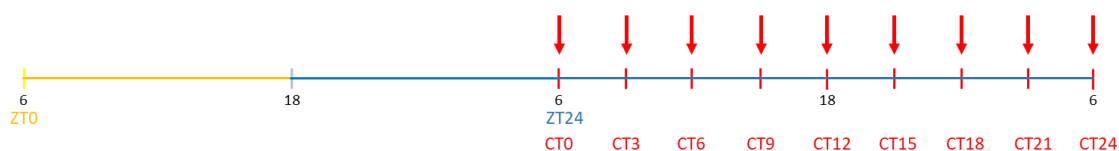
Pro stanovení denního profilu STAT3, STAT5A a STAT5B v SCN a identifikaci buněčných typů exprimujících tyto proteiny byla experimentální zvířata chována na režimu LD 12:12. Zvířata byla ve 4hodinových intervalech 24hodinového cyklu (obr. 8) anestezována pomocí intraperitoneálně aplikované injekce thiopentalu (50 mg/kg) a za aplikace heparinu (500 U) byla provedena perfuze aortou. Po aplikaci fyziologického roztoku (0,01M PBS, pH 7,2) kanylou za účelem promytí tkání a následné aplikaci 4% paraformaldehydu (PFA v 0,01M PBS) zajišťujícího tkáňovou fixaci byly vyjmuty mozky, které byly postfixovány v 4% PFA po dobu 12 hodin při 4 °C. Vypreparované mozky byly přesunuty do kryoprotektivního roztoku sacharózy (20% sacharóza v 0,01M PBS) na dobu 24 hodin, poté zamrazeny na jemně nadrceném suchém ledu a uloženy v -80 °C, kde byly uchovány před dalším zpracováním metodou imunohistochemie plovoucích řezů („free floating“ imunohistochemie) a fluorescenční imunohistochemií pro určení lokalizace proteinů STAT v buněčných typech SCN.



Obr. 8: Časová osa odběru vzorků ke stanovení denního profilu *STAT3*, jeho fosforylovaných forem, *STAT5A* a *STAT5B* a pro určení lokalizace v buněčných typech SCN potkana. Na ose je znázorněn 24hodinový úsek režimu LD 12:12 (světla byla rozsvícena od 6 do 18 hodin), kde černé číslice značí čas v hodinách, barevné číslice označují čas cirkadiánní. „Zeitgeber time“ (ZT) znázorňuje čas v podmínkách, kde jsou vnějším synchronizátorem světlo a tma. ZT0 udává čas v době rozsvícení, ZT12 značí čas zhasnutí. Barevné šipky označují časy, kdy byly prováděny odběry zvířat. Experiment byl proveden dvakrát, přičemž v každém bodu odběru $n = 3$.

5.2.2. Denní rytmus v expresi *Stat3* v SCN

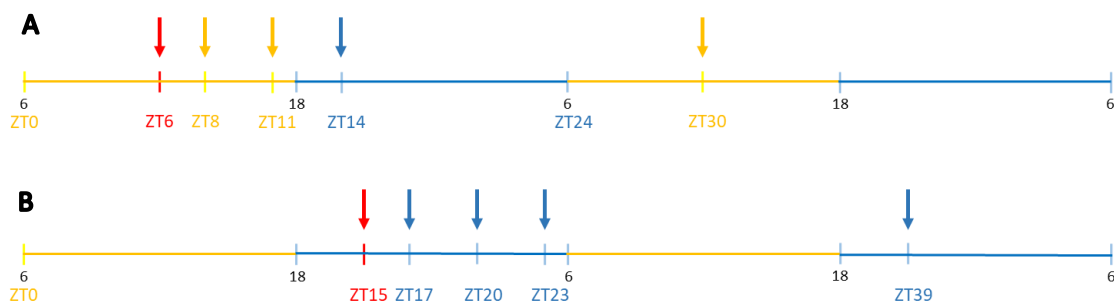
Pro sledování rytmické exprese *Stat3* v SCN byla experimentální zvířata adaptována na světelný režim LD 12:12. V den experimentu byla zvířata vystavena podmínkám konstantní tmy, to znamená, že jim v obvyklou dobu (tzn. v 6 hodin ráno, obr. 9) nebylo rozsvíceno. Zvířata byla usmrcována v 3hodinových intervalech rychlou dekapitací pod anestézií intraperitoneální injekcí aplikovaného thiopentalu (50 mg/kg), počínaje dobou předpokládaného rozsvícení. Tato doba byla označena jako cirkadiánní čas 0 (CT0). Cirkadiánní čas (CT) je řízen endogenními cirkadiánními hodinami organismu bez vlivu vnějších synchronizátorů, tzv. zeitgeberů. CT0 označuje začátek subjektivního dne a u denních organismů (např. člověk) je definován jako začátek aktivity, CT12 pak značí začátek subjektivní noci a je definován jako počátek aktivity u nočních organismů (např. laboratorní potkan). Mozky byly ihned vyjmuty z lebky a zamraženy na jemně nadrceném suchém ledu a uloženy v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly uchovány před dalším zpracováním metodou *in situ* hybridizace.



Obr. 9: Časová osa odběru vzorků pro sledování rytmické exprese *STAT3* v SCN potkana. Na ose jsou zobrazeny dva 24hodinové úseky, kdy první úsek znázorňuje LD režim a druhý úsek DD režim. Černé číslice značí čas v hodinách, barevné číslice označují čas cirkadiánní. „Zeitgeber time“ (ZT) znázorňuje čas v podmínkách, kde jsou vnějším synchronizátorem světlo a tma. ZT0 udává čas v době rozsvícení. Cirkadiánní čas (CT) je řízen endogenními cirkadiánními hodinami organismu bez vlivu vnějších synchronizátorů, tzv. zeitgeberů. CT0 udává začátek subjektivního dne v prvním cyklu po vystavení podmínkám konstantní tmy. Červené šipky znázorňují jednotlivé odběry zvířat v 3hodinových intervalech v průběhu 24hodinového cyklu. V každém bodu odběru $n = 3-4$.

5.2.3. Účinek intraperitoneální injekce LPS na hladiny fosforylovaných forem proteinu *STAT3* a jejich lokalizace v buněčných typech SCN

Pro zkoumání účinku LPS na hladiny p*STAT3* v SCN a jejich lokalizaci v buněčných typech bylo použito 48 dospělých potkanů. Dvanácti zvířatům byl intraperitoneální injekcí podán LPS (z *Escherichia coli*, kmen 055:B5; Sigma-Aldrich) v dávce 1 mg/kg 6 hodin po rozsvícení (ZT6, obr. 10A) a dalším dvanácti zvířatům 3 hodiny po zhasnutí (ZT15, obr. 10B). K oběma skupinám s aplikovaným LPS byly vytvořeny odpovídající kontrolní skupiny, kterým byl intraperitoneální injekcí aplikován fyziologický roztok. V časových bodech 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po systémové aplikaci LPS byla zvířata ($n = 3$ pro každou skupinu v každém časovém bodě odběru) anestetizována intraperitoneální injekcí thiopentalu (50 mg/kg) a byla provedena perfuze stejným způsobem, jak je uvedeno výše (kapitola 5.2.1.), včetně uskladnění tkání. Detekce fosforylovaných forem proteinu *STAT3* byla provedena metodou imunohistochemie plovoucích řezů a fluorescenční imunohistochemií pro určení lokalizace fosforylovaných forem proteinu *STAT3* v buněčných typech SCN po aplikaci LPS.



Obr. 10: Časová osa odběru vzorků po denní (A) a noční (B) aplikaci LPS pro zjištění jeho účinků na hladiny fosforylovaných forem proteinu STAT3 a lokalizaci v buněčných typech SCN. Na ose jsou zobrazeny dva 24hodinové úseky režimu LD 12:12. ZT0 (6 hodin) udává čas v době rozsvícení, ZT12 (18 hodin) značí čas zhasnutí. Černé číslice značí čas v hodinách, barevné číslice označují čas cirkadiánní. Červená šipka znázorňuje systémovou aplikaci LPS (1 mg/kg) ve dne (A; ZT6, tzn. 6 hodin po rozsvícení) nebo v noci (B; ZT15, tzn. 3 hodiny po zhasnutí), žluté a modré šipky znázorňují jednotlivé odběry zvířat 2 hodiny (A, ZT8; B, ZT17), 5 hodin (A, ZT11; B, ZT20), 8 hodin (A, ZT14; B, ZT23) a 24 hodin (A, ZT30; B, ZT39) po denní (A) a noční (B) aplikaci LPS. Experiment byl proveden dvakrát, přičemž v každém bodu odběru $n = 3$ pro kontrolní i pro LPS skupinu.

5.2.4. Účinek intraperitoneální injekce LPS na mRNA expresi hodinových genů, *Stat3* a hladiny fosforylovaných forem proteinů ERK1/2 a GSK3 β

K určení účinku LPS na změny v úrovni mRNA hodinových genů a *Stat3* a hladiny proteinů pERK1/2 a pGSK3 β v SCN byla zvířata adaptována na světelný režim LD 12:12. V ZT6 (tzn. 6 hodin po rozsvícení) nebo v ZT15 (tzn. 3 hodiny po zhasnutí) byl experimentálním zvířatům aplikován intraperitoneální injekcí LPS (1 mg/kg), současně byl kontrolním zvířatům podán intraperitoneální injekcí fyziologický roztok. Čtyři zvířata z LPS a čtyři zvířata z kontrolní skupiny byla anestezizována intraperitoneální injekcí thiopentalu (50 mg/kg) 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po podání LPS a fyziologického roztoku (obr. 10). Zvířatům byla provedena perfuze aortou (jak je popsáno v kapitole 5.2.1.) pro následné zpracování imunohistochemickou technikou, nebo byla zabita rychlou dekapitací pro stanovení genové exprese metodami *in situ* hybridizace a Real-time PCR. V každém bodu odběru $n = 4$ pro kontrolní i LPS skupinu.

5.3. Měření lokomoční aktivity

Pro nahrávání lokomočního záznamu bylo 20 experimentálních zvířat rozděleno jednotlivě do plastových boxů a adaptováno na světelný režim LD 12:12. Na každý box se zvířetem byl připevněn senzor (Mini-Mitter VitalView od firmy Starr), který snímá

pohyb zvířete za pomoci infračerveného záření. Monitorování lokomoční aktivity zvířat započalo 3 dny před vlastním experimentem a tento záznam sloužil jako vnitřní kontrola pro celkovou aktivitu, rozdíl v akrofázi a amplitudě zvířete před a v průběhu experimentu. V den experimentu, který byl označen jako LD 0, byl 10 zvířatům podán intraperitoneální injekcí LPS (1 mg/kg) v ZT6 (tzn. 6 hodin po rozsvícení) a dalším 10 zvířatům byla stejná dávka LPS aplikována v ZT15 (tzn. 3 hodiny po zhasnutí). Lokomoční aktivita byla monitorována po dobu 12 dní a získaná data byla uložena do počítače se softwarem ClockLab (Actimetrics) umožňujícím sledování aktuálních záznamů (tzv. aktogramů) a pro následné hodnocení, které probíhalo kosinorovou analýzou v programu GraphPad Prism 6, jak bylo popsáno v Soták et al., 2011 a Hahnová et al., 2016. Aktivita nashromážděná v 1hodinových intervalech byla proložena kosinusovou křivkou, která vychází z rovnice: $f(t)=M+A.\cos(2\pi t/T-\phi/T)$, kde t reprezentuje čas, M představuje mesor (střední hodnota, kolem které kosinusová křivka osciluje), A značí amplitudu (rozdíl mezi maximální hodnotou a průměrem), T je délka periody a ϕ označuje akrofázi (doba, kdy je dosaženo maxima). Délka periody byla definována jako 24 hodin. Výsledná data byla vynesena jako průměr z 10 zvířat, akrofáze a amplituda byly vyčteny z kosinusové křivky.

5.4. Imunohistochemie plovoucích řezů

Mozky byly nakrájeny na 30 μm široké koronální řezy v oblasti od rostrální po kaudální část SCN přístrojem cryocut (Leica CM 1860) při $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Řezy byly ihned vkládány pomocí jemného štětce do plastových jamek s fosfátovým pufrům (PBS). Všechny řezy mozků z jednoho pokusu byly zpracovávány současně za identických podmínek. Pro zablokování endogenních peroxidáz byly řezy inkubovány v 0,5% peroxidu vodíku (ředěno v 0,01M PBS) po dobu 10 minut. Pro detekci fosforylovaných forem STAT3 byly řezy inkubovány v 1% hydroxidu sodném a 1% peroxidu vodíku po dobu 20 minut, v 0,3% glycinu po dobu 10 minut a v 0,03% dodecylsulfátu sodném po dobu 10 minut (Frontini et al., 2008). Poté byly řezy důkladně promyty v PBS 3x5 minut. Následně pro zablokování nespecifického pozadí byly řezy inkubovány po dobu 1 hodiny v 2% séru (ředěno v 1% hovězím sérovém albuminu, BSA s 0,3% Tritonem X-100), které bylo zvoleno podle druhu sekundární protilátky. Poté byly řezy přeneseny do primární protilátky ředěné v 1% BSA (tabulka 1) a inkubovány přes noc ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byly řezy promyty 2x5 minut v 0,3% BSA a poté přeneseny do biotinylované sekundární

protilátky ředěné v 0,3% BSA (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 1:600) a inkubovány při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Řezy byly poté promyty 2x5 minut v 0,3% BSA a následně inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě za účelem amplifikace signálu v avidin-biotin-peroxidázovém komplexu (v 0,3% BSA; 1:400). Poté byly řezy promyty 5 minut v 0,3% BSA, 2x5 minut v PBS a následně inkubovány podle potřeby (20 sekund – 20 minut) v roztoku 3,3'-diaminobenzidinu (chromogenová 10mg tableta rozpuštěná v 20 ml PBS a 7 μ l 30% peroxidu vodíku) sloužícímu k detekci komplexu pomocí chromogenu. Poté byly řezy promyty 2x5 minut v PBS a byly natahovány pomocí jemných štětců na želatinovaná podložní skla. Po zaschnutí řezů byla skla naskládána do stojanů a ponořena do alkoholové dehydratační řady (3 minuty v 70% ethanolu, 2x3 minuty v 96% ethanolu) a xylenové prosycující řady (3x3 minuty v xylenu). Dehydratovaná a prosycená skla byla poté pokapána DPX médiem (DPX Mountant for histology, Sigma-Aldrich) a překryta krycím sklem. Takto zamontovaná skla byla sušena při pokojové teplotě minimálně 2 dny, poté se očistila pomocí žiletky a vyleštila ethanolem. Preparáty byly nafoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus Provis AX70. Imunopozitivní buňky v oblasti SCN od mediální po kaudální část byly manuálně vybrány, označeny a hodnoceny pomocí softwaru ImageJ (NIH). SCN bylo rozděleno na ventrolaterální a dorsomediální části podle detekce imunopozitivních buněk pERK1/2 v ZT15 a ZT6, respektive bylo použito celé SCN podle detekce imunopozitivních buněk STAT3 v ZT4 a šablony byly uloženy a používány pro analýzu jednotlivých obrazů. Výsledky byly vyjádřeny jako průměry hodnot z levého a pravého SCN z minimálně 2 řezů SCN. V případě binárních černobílých obrázků byly mikrofotografie převedeny na 16bitové obrázky a upraveny pomocí automatického prahu citlivosti.

Tab. 1: Primární protilátky používané při imunohistochemickém stanovení

antigen	popis imunogenu	dodavatel, zdroj protilátek, katalogové a identifikační číslo	používané ředění
STAT3	STAT3 fúzní protein odpovídající karboxy-terminální sekvenci myšího STAT3 proteinu	Cell Signaling Technology, králičí monoklonální protilátka, 4904, AB_10693927	1:300
pSTAT3 (Tyr705)	syntetický fosfopeptid odpovídající aminokyselinovému zbytku v okolí Tyr705 myšího STAT3 proteinu	Cell Signaling Technology, králičí monoklonální protilátka, 9145, AB_561305	1:300
pSTAT3 (Ser727)	syntetický fosfopeptid odpovídající aminokyselinovému zbytku v okolí Ser727 myšího STAT3 proteinu	Cell Signaling Technology, králičí polyklonální protilátka, 9134, AB_331589	1:300
STAT5A	peptid odpovídající karboxy-terminální sekvenci myšího STAT5A spojeného s proteinovým nosičem	Invitrogen, myší monoklonální protilátka (klon ST5a-2H2), 13-3600, AB_86591	1:100
STAT5B	peptid odpovídající karboxy-terminální sekvenci myšího STAT5B spojeného s proteinovým nosičem	Invitrogen, králičí polyklonální protilátka, 71-2500, AB_88026	1:100
pSTAT5A	syntetický fosfopeptid zahrnující karboxy-terminální tyrosinové fosforylační místo (Tyr694) myšího STAT5	Invitrogen, králičí polyklonální protilátka, 71-6900, AB_10836771	1:100
GFAP	GFAP z prasečí míchy	Abcam, Cy3-konjugovaná myší monoklonální protilátka, ab49874, AB_880203	1:400
pERK1/2	syntetický fosfopeptid odpovídající aminokyselinovému zbytku v okolí Thr202/Tyr204 lidské p44 MAP kinázy	Cell Signaling Technology, králičí polyklonální protilátka, 9101, AB_331646	1:1500
pGSK3β	syntetický fosfopeptid odpovídající aminokyselinovému zbytku v okolí Ser9 lidské GSK3β	Cell Signaling Technology, králičí monoklonální protilátka, 5558, AB_2798365	1:600

Specifická protilátek používaných v našich studiích je spolehlivá a v mozkové tkáni byla ověřena (Bennett et al., 2005; Ma et al., 2005; Frontini et al., 2008).

5.4.1. Fluorescenční imunohistochemie

Fluorescenční stanovení proteinu probíhalo podobným způsobem, jako imunohistochemie plovoucích řezů. Pro zablokování nespecifického pozadí byly řezy inkubovány v 2% oslím séru ředěném v 1% BSA s 0,3% Tritonem X-100 po 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byla provedena metoda dvojité imunofluorescence. Řezy byly nejprve inkubovány přes noc při 4 °C v primárních protilátkách proti STAT proteinům (tabulka 1). Druhý den byly řezy promyty 3x5 minut v 0,3% BSA a poté přeneseny do fluorescenčně značené sekundární protilátky (rabbit anti-mouse a goat anti-rabbit IgG

konjugované s fluorochromem Alexa 488; Abcam, ředění 1:500). Ředění, aplikace sekundární protilátky a následný postup fluorescenční imunohistochemie probíhal v místnosti s omezeným přístupem světla. Inkubace v sekundární protilátce probíhala při pokojové teplotě po dobu 2 hodin se vzorky zakrytými alobalem. Poté byly řezy promyty 3x5 minut v 0,3% BSA a přeneseny do 2% koňského séra (ředěno v 1% BSA s 0,3% Tritonem X-100) a inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byly řezy přeneseny do fluorescenčně značené primární protilátky proti GFAP (ředěné v 1% BSA, tabulka 1) a inkubovány přes noc při 4 °C. Po ukončení inkubace byly řezy promyty 3x5 minut v PBS, nataženy pomocí jemných štětců na želatinovaná podložní skla, zakapány montovacím médiem s odolností proti blednutí (ProLong Gold Antifade Mountant, Life Technologies) a překryty krycím sklem. Takto zamontovaná skla byla skladována při 4 °C v alobalu nebo ihned nafocena konfokálním mikroskopem.

5.5. *In situ* hybridizace

Mozky byly nakrájeny na 12 µm široké koronální řezy v oblasti SCN od rostrální po kaudální část pomocí přístroje cryocut (Leica) při -23 °C. Řezy byly přichyceny na skla opatřená úpravou SuperFrost a byly uchovávány v -80 °C před zpracováním metodou *in situ* hybridizace, která byla popsána již dříve (Matějů et al., 2009). Pro detekci *Stat3*, *Per1*, *Per2* a *Nr1d1* mRNA byly použité cDNA sondy značené radioaktivní sírou ³⁵S inkorporovanou do uridintrifosfátu (UTP; American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA). Pro detekci *Stat3* mRNA byla použita cDNA sonda dlouhá 423 párů bazí, vytvořená v naší laboratoři, pro detekci *Per1* mRNA byla použita cDNA sonda dlouhá 980 párů bazí, odpovídající sekvenci 581-1561 v GenBank (no. AB002108), pro detekci *Per2* mRNA byla použita cDNA sonda dlouhá 1512 párů bazí, odpovídající sekvenci 369-1881 v GenBank (no. NM031678) a pro detekci *Nr1d1* mRNA byla použita cDNA sonda dlouhá 325 párů bazí, odpovídající sekvenci 33-357 v GenBank (no. NM001113422).

5.5.1. Linearizace plazmidu pro přípravu antisense cRNA sondy a radioaktivní značení cRNA sondy pomocí *in vitro* transkripce

Ke 40 µl DNA (*Stat3*, *Per1*, *Per2* a *Nr1d1*) bylo přidáno 5 µl restričního pufru a 5 µl restriční endonukleázy (v pořadí podle DNA: SalII, SalII, SalII, SacII; SP6/T7 MAXIscript kit, Applied Biosystems, Austin, TX, USA) a tato reakční směs byla inkubována v termobloku při 37 °C po dobu 3 hodin. Poté bylo přidáno 5 µl (1/10

objemu) 3M octanu sodného a 165 μ l (3x celkový objem) ledového 96% ethanolu a směs byla inkubována přes noc v -20 °C. Druhý den byly vzorky centrifugovány na 10 000 g po dobu 20 minut při 4 °C. Supernatant byl odsát a k peletu bylo přidáno 150 μ l ledového 70% ethanolu. Centrifugace probíhala při 10 000 g a 4 °C po dobu 20 minut a tento krok byl proveden třikrát. Vzorky byly poté nechány vyschnout a pelety byly rozpuštěny ve 12 μ l vody. Koncentrace a čistota linearizovaného plazmidu byla zjištěna pomocí přístroje NanoDrop a plazmid byl uchováván v -20 °C před použitím pro radioaktivní značení.

Do sterilní zkumavky byl napipetován 1 μ g linearizovaného plazmidu, 2 μ l 10x transkripčního pufru, po 1 μ l od každého roztoku nukleotidů (10mM ATP, 10mM CTP, 10mM GTP a neznačené 200 μ M UTP), 5 μ l 35 S inkorporované do UTP ($[^{35}\text{S}]\text{-UTP}$) a 2 μ l RNA polymerázy (SP6 pro Nr1d1/T7 pro ostatní plazmidy). Reakční směs byla doplněna do 20 μ l sterilní vodou bez aktivity nukleáz (DNase/RNase free water), byla promíchána a inkubována v termobloku při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl ke směsi přidán 1 μ l DNázy I, směs byla krátce zvortexována a inkubována ve 37 °C po dobu 20 minut. Kolonky Chroma-spin (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) byly centrifugovány po dobu 5 minut při 700 g při pokojové teplotě, poté byl na kolonku přidán 1 μ l sterilní kyseliny ethylendiamintetraoctové (0,5M EDTA, pH8), 20 μ l směsi s radioaktivně značenou sondou a 20 μ l vody bez aktivity nukleáz. Kolonka byla centrifugována při 1 000 g po dobu 5 minut při pokojové teplotě, byla stanovena inkorporace $[^{35}\text{S}]\text{-UTP}$ do sondy a radioaktivně značená sonda byla uchována v -20 °C před použitím při hybridizaci.

Stanovení inkorporace $[^{35}\text{S}]\text{-UTP}$ do sondy bylo provedeno TCA (kyselina trichloroctová) precipitací. Nejprve byl smíchán 1 μ l radioaktivně značené sondy s 19 μ l destilované vody. Naředěná sonda o objemu 2 μ l byla nakapána na filtrační papír a nechána oschnout. Část zaschnutých filtračních papírů byla vložena do scintilačních zkumavek s 5 ml scintilačního roztoku (total). Zbylé filtrační papíry byly promyty 3x po dobu 5 minut v ledové 10% TCA a 1x po dobu 5 minut v ledovém 96% ethanolu. Po oschnutí byly filtrační papíry vloženy do scintilačních zkumavek s 5 ml scintilačního roztoku a byly vloženy do beta counteru (Beckman Coulter), ve kterém probíhalo měření. Z poměru hodnot cpm (counts per minute) nepročištěné a pročištěné sondy bylo vypočítáno procento inkorporace $[^{35}\text{S}]\text{-UTP}$ do sondy.

5.5.2. Prehybridizace

Skla s řezy mozku v oblasti SCN byla vyjmuta z -80 °C, vyskládána na filtrační papír a temperována po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Poté byla skla naskládána do sterilních stojanů a byla fixována ve 4% PFA v PBS s diethylpyrokarbonátem (DEPC-PBS) po dobu 40 minut. Poté byla skla 2x 5 minut promyta v DEPC-PBS a vložena na 20 minut do 0,2N kyseliny chlorovodíkové pro deproteinaci. Poté byla skla promyta po dobu 5 minut v DEPC-PBS a inkubována 2 minuty v 0,1M triethanolaminu na třepačce. Skla byla poté přesunuta do 0,25% roztoku acetanhydridu v triethanolaminu a inkubována po dobu 10 minut. Poté byla skla promyta po dobu 5 minut v DEPC-PBS, dehydratována nejprve v 70% ethanolu a poté v 96% ethanolu. Skla byla vyskládána na filtrační papír a ponechána uschnout.

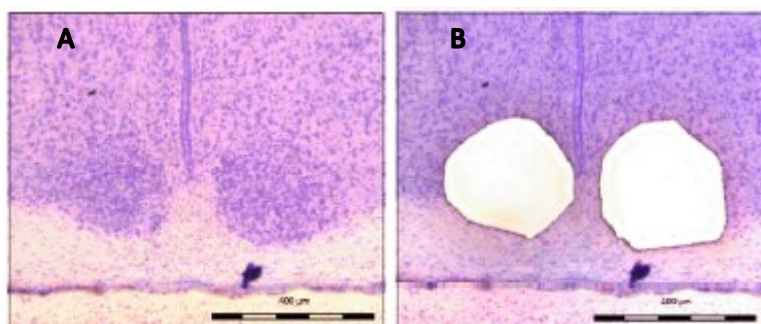
5.5.3. Hybridizace, autoradiografie a analýza hybridizačního signálu

K 1 µl hybridizačního pufru bylo přidáno 100 µl 0,5M dithiotreitolu a směs byla důkladně promíchána na vortexu. Poté byla přidána radioaktivně značená sonda (1-5.10⁷ cpm/1 ml hybridizačního pufru) a směs byla denaturována 5 minut při 85 °C. Po denaturaci byla směs umístěna v 60 °C a nanášena na krycí skla, na která byla přikládána podložní skla s řezy. Skla byla vyskládána do hybridizačních krabic, obalena alobalem a inkubována 18 hodin v 60 °C. Poté byla krycí skla odmyta v roztoku 2xSSC (saline sodium citrate) a inkubována po dobu 30 minut v roztoku 2xSSC. Po uplynutí doby inkubace byla skla přesunuta do roztoku RNázy v RNázovém pufru (10 µg/ml) a byla inkubována ve vodní lázni při 42 °C po dobu 1 hodiny. Poté byla skla promývána v 2xSSC při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následně ve vodní lázni při 60 °C v 0,1xSSC 2x 30 minut. Skla byla vyjmuta z vodní lázně a inkubována při pokojové teplotě v 0,1xSSC 2x po dobu 20 minut. Poté byla skla postupně dehydratována v 70% ethanolu po dobu 5 minut a 96% ethanolu po dobu 5 minut. Skla byla vyskládána na filtrační papír a ponechána oschnout, poté byla naskládána do autoradiografických kazet a v temné místnosti byl přiložen vysoce citlivý film (Kodak Bio Max Cassette). Autoradiografické kazety byly uschovány v -20 °C s expozicí 10 dní. Všechny skupiny byly zpracovávány současně za identických podmínek. Autoradiografické otisky řezů byly nafoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus Provis AX70 a následně hodnoceny pomocí softwaru ImageJ (NIH). Intenzita specifického hybridizačního signálu byla vyjádřena jako rozdíl relativní optické denzity mediálně-kaudální oblasti SCN a

relativní optické denzity pozadí, za které byla považována přilehlá oblast hypotalamu s nízkou optickou denzitou. Výsledná relativní optická denzita byla vyjádřena jako průměr relativní optické denzity v levé a pravé části SCN.

5.6. Laserová mikrodisekce

Mozky byly nakrájeny na 20 μm široké koronální řezy v oblasti SCN od rostrální po kaudální část pomocí přístroje cryocut (Leica) při $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Řezy byly přichyceny na skla opatřená polyethylennaftalátovou membránou (PEN skla), ihned barveny kresylovou violetí po dobu 1 minuty a následně byly SCN izolovány laserovou mikrodisekcí (LMD 6000, Leica, Fyziologický ústav AVČR; obr. 11) do 20 μl RLT pufru (součástí kitu pro izolace RNA, RNeasy Plus Micro Kit, Qiagen). Vzorky byly krátce stočené na stolní centrifuze, následně důkladně promíchané na vortexu, poté opět krátce stočené na stolní centrifuze a vložené do suchého ledu. Po zpracování všech mozků laserovou disekcí byly vzorky uchovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do druhého dne. Celková plocha takto vyizolovaných SCN byla v rozmezí 2 000 000 – 2 700 000 μm^2 .



Obr. 11: Reprezentativní fotografie koronálních řezů v oblasti SCN před (A) a po (B) izolaci pomocí laserové mikrodisekce. Barvení kresylovou violetí, měřítko = 400 μm .

5.7. Izolace RNA a Real-time PCR

Celková RNA byla izolována s použitím kitu RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) podle pokynů od výrobce. K 20 μl vzorku bylo přidáno 45 μl RLT pufru a vzorek byl důkladně promíchán pipetováním. Poté bylo přidáno stejné množství 70% etanolu, vzorek byl opět důkladně promíchán, nanesen na filtrační kolonku a centrifugován při 10 000 g po dobu 1 minuty. RNA ze vzorku se navázala na kolonku, filtrát byl vylit a následně byly na filtrační kolonku nanесeny promývací roztoky. Nejprve bylo nanесeno 700 μl RW1 pufru, kolonka byla centrifugována 1 minutu při 10 000 g a filtrát byl vylit. Na filtrační kolonku bylo poté nanесeno 500 μl RPE pufru, kolonka byla centrifugována po

dobu 1 minuty při 10 000 g a filtrát byl opět vylit. Na kolonku bylo dále nanášeno 500 µl 80% etanolu a byla centrifugována 2 minuty při 10 000 g. Po vylití filtrátu byla kolonka centrifugována na sucho 2 minuty při 10 000 g k odstranění přebytečného etanolu a byla přenesena do čisté zkumavky. Nakonec bylo na kolonku nanášeno 13 µl vody bez aktivity nukleáz (DNase/RNase free water) a kolonka byla centrifugována 2 minuty při 10 000 g. Čistota a koncentrace celkové RNA byla zjištěna pomocí přístroje NanoDrop. Koncentrace celkové RNA byla v rozmezí 7,2 – 9,7 ng/µl. V následné reverzní transkripci byl 1 µg celkové RNA přepsán do cDNA pomocí dvoukrokového kitu Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT (Sigma-Aldrich) v celkovém objemu reakční směsi 20 µl podle pokynů od výrobce. Množství komponent použitých na 1 vzorek reakční směsi je uvedeno v tabulce 2. Reakční směs pro první krok reverzní transkripce a celková RNA byly smíchány v celkovém objemu 10 µl v 200µl zkumavkách, zkumavky byly krátce stočeny a umístěny do přístroje T100 Thermal Cycler (Bio-Rad), kde nejprve probíhala denaturace RNA při 70 °C po dobu 10 minut. Poté byla k denaturované RNA přidána reakční směs pro druhý krok reverzní transkripce do celkového objemu 20 µl a reverzní transkripce probíhala při teplotě 25 °C po dobu 15 minut a při 42 °C po dobu 50 minut.

Tab. 2: Množství složek pipetovaných na 1 reakci reverzní transkripce pomocí dvoukrokového kitu Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT a nastavení programu v přístroji Thermal Cycler

1. krok reverzní transkripce	
8 µl	celková RNA
1 µl	deoxynucleotide mix
1 µl	random nonamers
70 °C, 10 minut	
2. krok reverzní transkripce	
2 µl	10X Buffer for AMV-RT
1 µl	Enhanced AMV-RT
1 µl	RNase Inhibitor
6 µl	PCR voda
25 °C, 15 minut; 42 °C, 50 minut; 4 °C, ∞	

Následně byla získaná cDNA preamplifikována s použitím kitu TaqMan™ PreAmp Master Mix (Life Technologies). Vzorky cDNA byly zředěny v poměru 1:4 s injekční vodou a 4 µl zředěných vzorků byly přeneseny do nově popsáných zkumavek. Ke vzorkům byla přidána preamplifikační směs skládající se z 5 µl TaqMan™ PreAmp

Master Mix a 1 µl zředěných fluorescenčně značených sond TaqMan Assays (Life Technologies; 1 µl od každé sondy napipetován do společné zkumavky v celkovém objemu 40 µl injekční vody; použité fluorescenční sondy TaqMan Assays; tabulka 3). Směs byla promíchána a krátce stočena na stolní centrifuze. Poté byly vzorky umístěny do přístroje T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) s nastaveným programem pro preamplifikaci (tabulka 4). Získaná preamplifikovaná cDNA byla uchována do druhého dne v -20 °C před použitím pro Real-time PCR analýzu.

Tab. 3: Fluorescenčně značené sondy TaqMan Assays použité pro preamplifikaci a při Real-time PCR analýze

Ref. No	symbol	název genu
Rn00680715_m1	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
Rn00667869_m1	Actb	actin, beta

Tab. 4: Program nastavený na přístroji Thermal Cycler použitý pro preamplifikaci cDNA

program	teplota	čas	počet cyklů
aktivace enzymu	95 °C	10 minut	1
denaturace	95 °C	15 sekund	14
nasedání a elongace	60 °C	4 minuty	
inaktivace enzymu	99 °C	10 minut	1
ukončení	4 °C	∞	1

Vzorky preamplifikované cDNA byly zředěny injekční vodou v poměru 1:9 a byly pipetovány po 1 µl do 384 jamkové destičky spolu s 19 µl Master Mixu obsahujícího 4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX; Baria), 1 µl fluorescenčně značené sondy TaqMan Assays (tabulka 3) a 14 µl injekční vody. Měření proběhla v celkovém objemu 20 µl. Před Real-time PCR analýzou byla destička překryta adhezivní folií a krátce centrifugována (1,5 minuty; 3000 rpm). Měření byla provedena v duplikátu na přístroji LightCycler 480 Instrument (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA) s nastaveným programem (tabulka 5). Výsledné relativní hladiny transkriptu Stat3 byly normalizovány k referenčnímu genu Aktin (Actb) a analýza relativní genové exprese byla provedena $\Delta\Delta CT$ metodou podle Livak a Schmittgen, 2001.

Tab. 5: Program nastavený na přístroji LightCycler 480 Instrument pro metodu Real-time PCR

program	teplota	čas	počet cyklů
aktivace enzymů	95 °C	15 minut	1
denaturace	95 °C	18 sekund	60
nasedání a elongace	60 °C	60 sekund	
ukončení	40 °C	30 sekund	1

5.8. Analýza a statistické zpracování dat

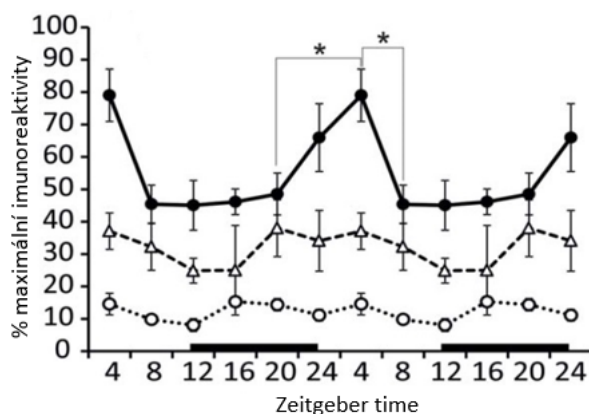
Výsledky byly vyjádřeny jako aritmetický průměr počtu imunopozitivních buněk z pravého i levého SCN a jako procento maximální hodnoty v každém imunohistochemickém stanovení, rozptyl dat jako standartní chyba průměru (SEM). V případě profilů pSTAT3 byly počty imunopozitivních buněk převedeny na procenta maximální hodnoty STAT3 v každém ze dvou imunohistochemických stanovení. Výsledky byly hodnoceny ve statistickém programu GraphPad Prism 6. Pro zjištění statistické významnosti mezi skupinami byla použita jednocestná analýza rozptylu (one-way ANOVA; 1W ANOVA). Jednocestná analýza rozptylu byla použita dále k určení cirkadiánní povahy genové exprese *Stat3* a analýze rytmicity lokomoční aktivity v čase. Dvoucestná analýza rozptylu (two-way ANOVA; 2W ANOVA) s následným Sidak-Bonferroni testem byla použita pro porovnání významnosti rozdílů mezi kontrolní a LPS skupinou v čase, také byla použita pro srovnání a zjištění rozdílů v lokomoční aktivitě mezi skupinami (v celkové aktivitě, akrofázi a amplitudě rytmtů). Hodnota statistické významnosti byla určena na hladině významnosti $p < 0,05$.

6. Výsledky

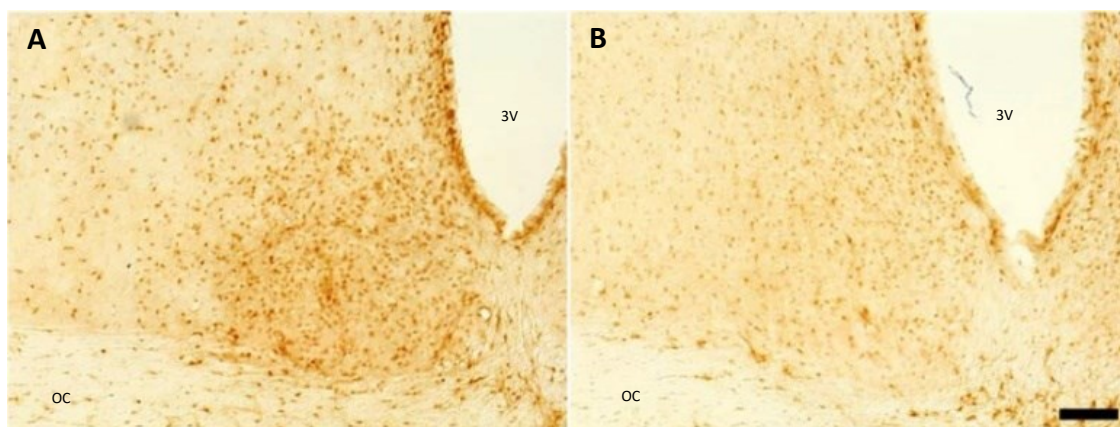
6.1. Cíl 1: Sledování hladin proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B, jejich lokalizace v buněčných typech SCN potkana a stanovení rytmické exprese mRNA *Stat3*

6.1.1. Stanovení denního rytmu proteinu STAT3, jeho fosforylovaných forem a proteinů STAT5A a STAT5B v SCN potkana

Denní profily proteinu STAT3 a jeho fosforylovaných forem pSTAT3(Y) a pSTAT3(S) byly hodnoceny v celém SCN, bez rozdělení na vlSCN a dmSCN. Z obr. 12 je patrné, že se hladina nefosforylovaného proteinu STAT3 významně změnila v průběhu 24hodinového cyklu (1W ANOVA: $F[11,34] = 3,707$; $P = 0,0016$). Počet buněk imunopozitivních na STAT3 signifikantně vzrostl mezi ZT20 a ZT4 ($F[6] = 8,626$; $P < 0,05$) a poklesl mezi ZT4 a ZT8 ($F[6] = 11,285$; $P < 0,05$; obr. 12 a obr. 13). Hladiny fosforylovaných forem pSTAT3(Y) a pSTAT3(S) nevykazovaly statisticky významný denní rytmus (1W ANOVA: pSTAT3(Y), $F[11,36] = 1,970$; $P = 0,0621$ a pSTAT3(S), $F[11,36] = 1,058$; $P = 0,4203$; obr. 12).

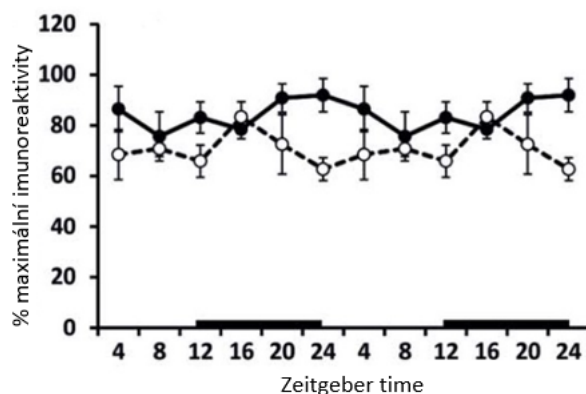


Obr. 12: Denní rytmus v hladinách proteinu STAT3. Pro lepší rozlišení jsou data vynesena dvojitě jako 2x 24hodinové periody LD 12:12, ZT0/ZT24 udává čas v době rozsvícení, ZT12 značí čas zhasnutí (doba noci je vyznačena černou úsečkou na ose x). Každý časový bod reprezentuje aritmetický průměr počtu imunopozitivních buněk \pm SEM z 5-6 zvířat a je vyjádřen jako procento maximálního počtu STAT3-imunopozitivních buněk v každém imunohistochemickém stanovení. Nefosforylovaná forma STAT3 – plná kolečka, pSTAT3(Y) – otevřená kolečka, pSTAT3(S) – trojúhelníky. * $P < 0,05$ značí statisticky významný rozdíl vzrůstu a poklesu v denním profilu proteinu STAT3, SEM – standardní chyba průměru.

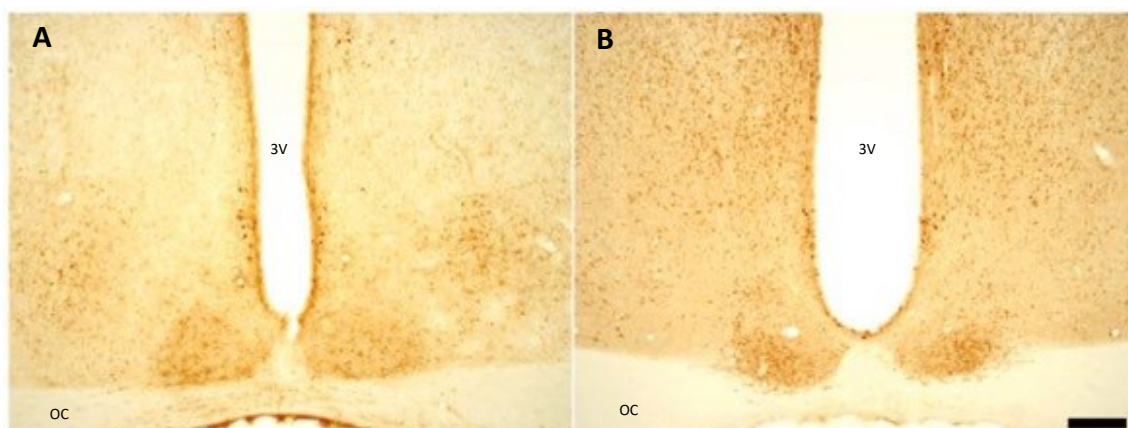


Obr. 13: Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů mediálním SCN s detekcí maximální hladiny proteinu STAT3 v ZT4 (A) a minimální hladiny v ZT12 (B). Měřítko = 100 μ m, 3V – 3. mozková komora, OC – optické chiasma.

Hladiny proteinů STAT5A a STAT5B také nevykazovaly statisticky významné denní rytmy v SCN (1W ANOVA: STAT5A, $F[11,34] = 1,786$; $P = 0,0935$ a STAT5B, $F[11,34] = 1,814$; $P = 0,0915$; obr. 14) a jejich exprese vykazovala konstantní úroveň především ve vlSCN (obr. 15).



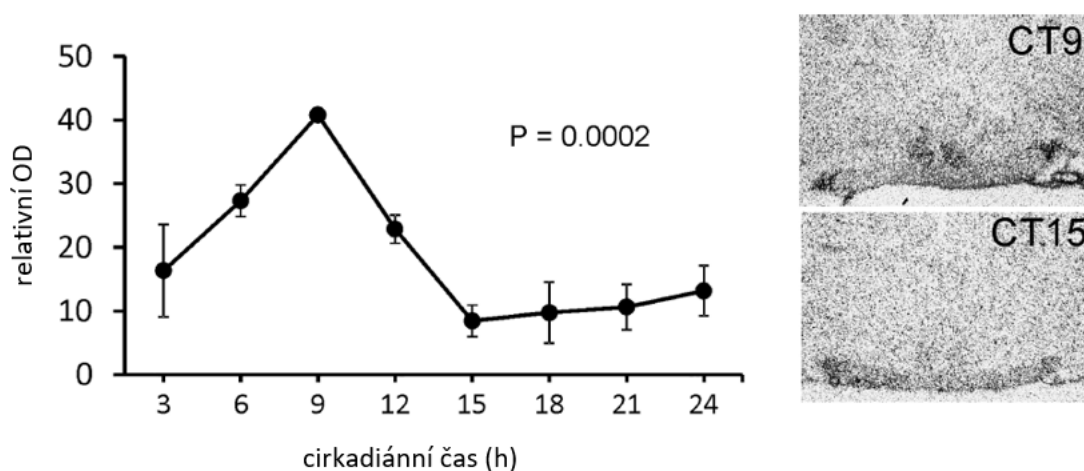
Obr. 14: Denní profily proteinů STAT5A (plná kolečka) a STAT5B (otevřená kolečka) nevykazují rytmickou expresi v SCN u potkana. Pro lepší rozlišení jsou data vynesena dvojité jako 2x 24hodinové periody LD 12:12, ZT0/ZT24 udává čas v době rozsvícení, ZT12 značí čas zhasnutí (doba noci je vyznačena černou úsečkou na ose x). Každý časový bod reprezentuje aritmetický průměr počtu imunopozitivních buněk \pm SEM z 5-6 zvířat a je vyjádřen jako procento maximální hodnoty v každém imunohistochemickém stanovení, SEM – standartní chyba průměru.



Obr. 15: Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů mediálním SCN s detekcí *STAT5A* (A) a *STAT5B* (B) v ZT8. Měřítka = 200 μ m, 3V – 3. mozková komora, OC – optické chiasma.

6.1.2. Stanovení denního rytmu v expresi *Stat3*

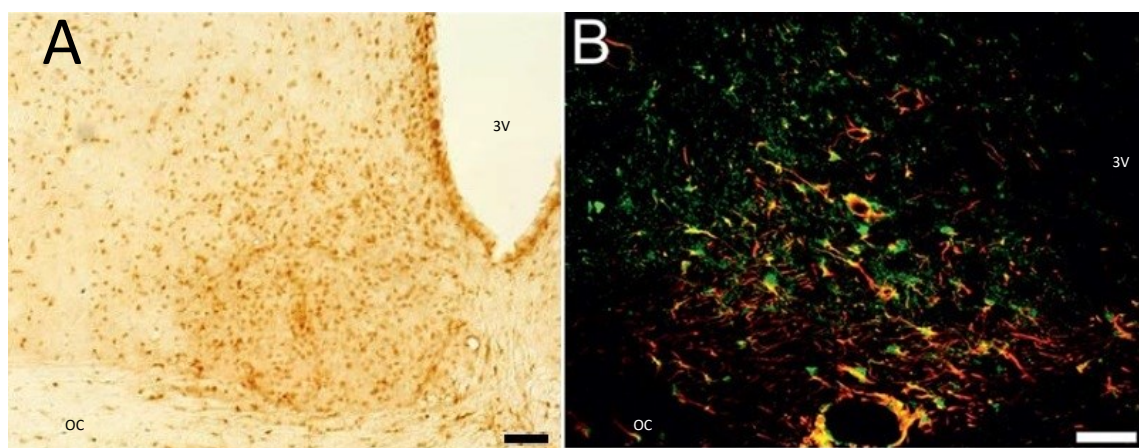
Pro určení, zda *Stat3* mRNA vykazuje podobně jako protein cirkadiánní rytmus v SCN potkana a pro zjištění, zda je STAT3 tedy regulován cirkadiánním mechanismem byla provedena metoda *in situ* hybridizace na koronálních řezech SCN. Jednocestná ANOVA prokázala cirkadiánní rytmus v expresi *Stat3* mRNA v režimu DD (1W ANOVA: $P = 0,0012$; obr. 16) a významná rytmicita byla také potvrzena kosinorovou analýzou (koeficient determinace $R^2 = 0,5327$; $P < 0,0002$).



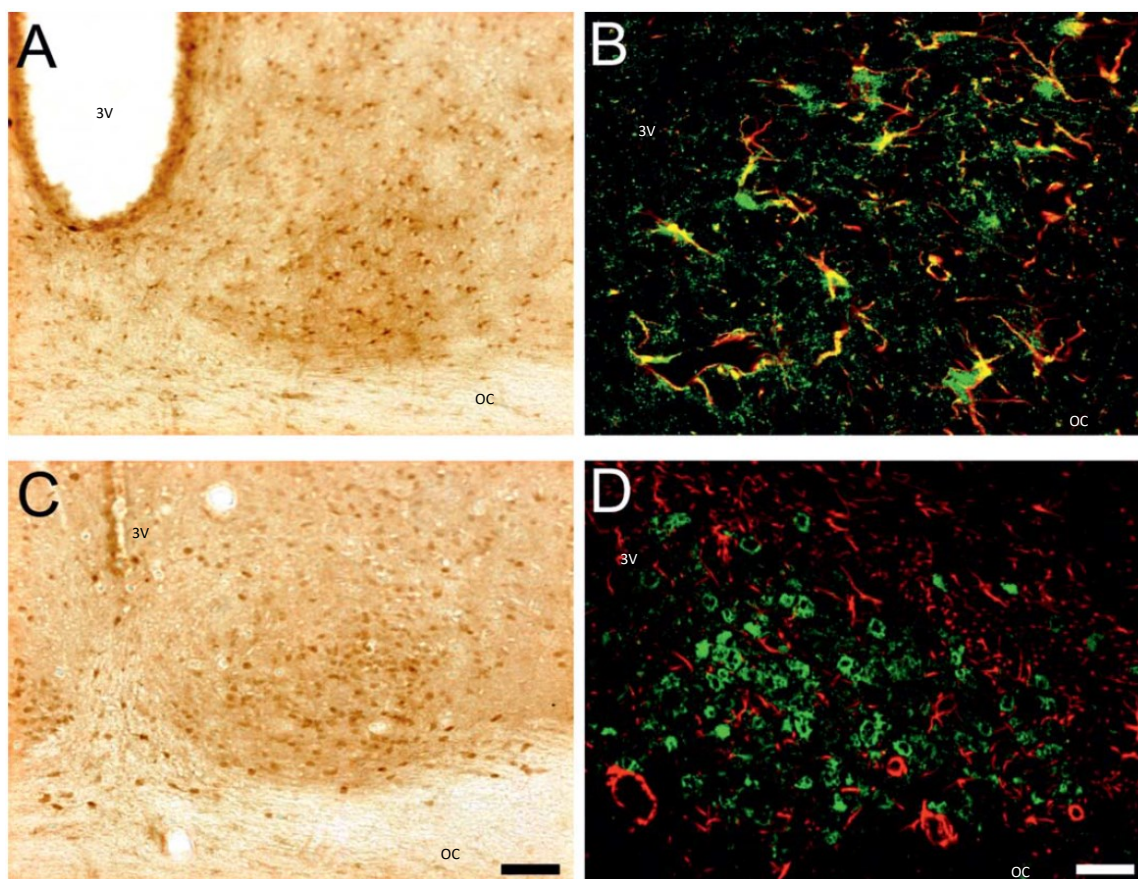
Obr. 16: Rytmičná exprese *Stat3* mRNA v SCN potkana. Data jsou vyjádřena jako relativní optická denzita (OD) specifického hybridizačního signálu. Každý bod reprezentuje průměr \pm SEM ze 3-4 zvířat. P hodnota představuje signifikantní cirkadiánní rytmus v expresi *Stat3* mRNA odhalený kosinorovou analýzou. Vpravo je zobrazen reprezentativní autoradiografický otisk koronálních řezů v oblasti SCN ukazující rozdíl v expresi *Stat3* mRNA v čase CT9 (čas maximální exprese) a CT15 (čas minimální exprese).

6.1.3. Identifikace buněčných typů exprimujících protein STAT3 a proteiny STAT5A a STAT5B

Jelikož jsou proteiny STAT často exprimované v astrocytech, zjišťovali jsme metodou dvojitého imunofluorescenčního značení, zda je tomu tak i v SCN. Naše výsledky ukázaly, že fluorescenční signál specifický pro STAT3 a STAT5A se překrývá s markerem astrocytů GFAP (z angl. glial fibrillary acidic protein; obr. 17 a obr. 18B). Oproti tomu protein STAT5B nebyl kolokalizován s GFAP (obr. 18D), což naznačuje, že STAT3 a STAT5A, ale nikoliv proteiny STAT5B, jsou exprimovány a lokalizovány v astrocytech také v SCN. Počet STAT3/GFAP exprimujících buněk byl v ZT4 106 ± 26 , což činí 83 % všech imunopozitivních buněk, počet STAT5A/GFAP exprimujících buněk činil v ZT4 93 ± 5 , což činí 87 % všech imunopozitivních buněk.



Obr. 17: Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů mediálním SCN s detekcí STAT3-imunopozitivních buněk pomocí diaminobenzidinové reakce (A) a kolokalizace (B, znázorněna žlutou barvou) STAT3 (zelená) s markerem astrocytů (GFAP, červená) dokazující expresi a lokalizaci STAT3 především v astrocytech. Měřítko = 100 μ m, 3V – 3. mozková komora, OC – optické chiasma.



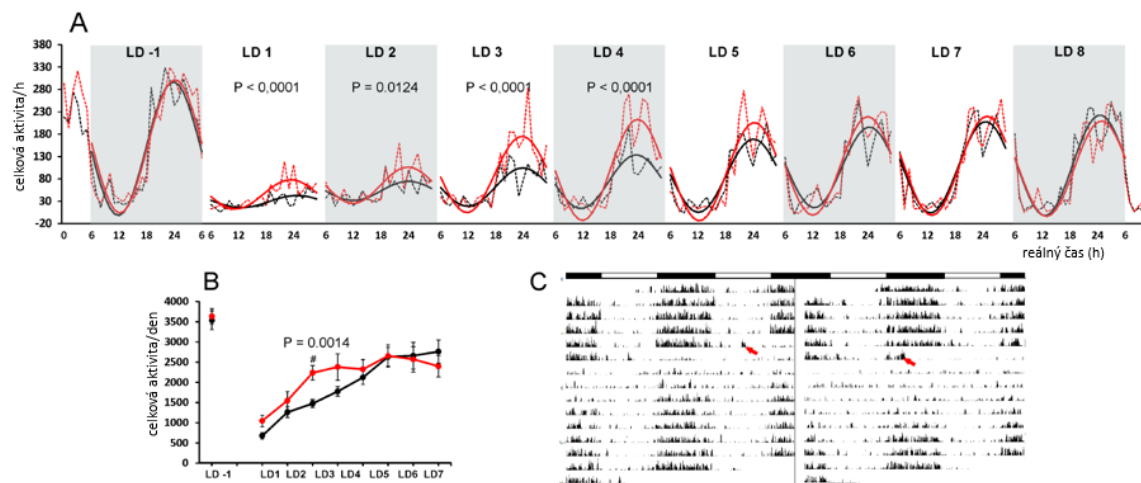
Obr. 18: Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů mediálním SCN s detekcí STAT5A (A, B) a STAT5B (C, D). Detekce STAT5A (A) a STAT5B (C) imunopozitivních buněk pomocí diaminobenzidínové reakce. Kolokalizace (znázorněna žlutou barvou) STAT5A (B, zelená) s markerem astrocytů (GFAP, červená) dokazující expresi a lokalizaci STAT5A především v astrocytech. Ve STAT5B-imunopozitivních buňkách nebyl nalezen pozitivní signál pro GFAP (D). Měřítka = 100 μ m (A, C), měřítko = 50 μ m (B, D), 3V – 3. mozková komora, OC – optické chiasma.

6.2. Cíl 2: Zkoumání účinku LPS na behaviorální rytmy u potkana, na změny v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* a v hladinách pERK1/2 a pGSK3 β , v expresi *Stat3* a hladinách fosforylovaných forem proteinu STAT3 v závislosti na čase aplikace

6.2.1. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na lokomoční aktivitu potkana

Systémová aplikace LPS vyvolává horečku a útlum pohybové aktivity. Sledovali jsme, jak rychle proběhne proces znovuobnovení rytmu v pohybové aktivitě potkana po intraperitoneální aplikaci LPS ve dvou denních dobách, uprostřed dne v ZT6 a v časné noci v ZT15 (obr. 19). Záznam lokomoční aktivity zvířat nahrávaný 3 dny před vlastní aplikací LPS sloužil jako vnitřní kontrola pro každou skupinu (na obr. 19A je znázorněn pouze poslední den před vlastním experimentem, LD -1). Během těchto 3 dní byl počet

záznamů snímacího zařízení měřený v intervalech 1 hodiny sečten, poté zprůměrován a vyjádřen jako celková aktivita za den. Pro skupinu zvířat, které byl později LPS aplikovaný v ZT6, tato hodnota činila 3632 záznamů za den a pro skupinu zvířat, které byl později LPS aplikovaný v ZT15, byl průměrný počet záznamů pohybu zvířete zaregistrovaný senzorem za den 3536 (obr. 19B). Ze záznamu pohybové aktivity měřeného po 3 dny před aplikací LPS byla stanovena amplituda rytmu (rozdíl mezi maximálním počtem záznamů pohybu zvířete za 1 hodinu a průměrnou aktivitou), pro skupinu zvířat později ovlivněnou LPS v ZT6 činila 149,3 záznamů za hodinu a pro skupinu zvířat později ovlivněnou LPS v ZT15 byla zjištěna amplituda 150 záznamů za hodinu. Dvoucestnou analýzou rozptylu byl odhalen signifikantní rozdíl mezi amplitudami obou skupin první den po aplikaci LPS (2W ANOVA: LD 1; $F[1,445] = 22,31$; $P < 0,0001$), druhý den po aplikaci LPS (2W ANOVA: LD 2; $F[1,450] = 6,302$; $P = 0,0124$), třetí den po aplikaci LPS (2W ANOVA: LD 3; $F[1,450] = 19,14$; $P < 0,0001$) a čtvrtý den po aplikaci LPS (2W ANOVA: LD 4; $F[1,450] = 16,7$; $P < 0,0001$; obr. 19A). Jednocestnou analýzou rozptylu byla potvrzena rytmicita v pohybové aktivitě u obou skupin již v LD 1 (1W ANOVA: skupina zvířat s injekčně aplikovaným LPS v ZT6: $F[24,213] = 21,31$; $P < 0,0001$; skupina zvířat s injekčně aplikovaným LPS v ZT15: $F[24,213] = 3,624$; $P < 0,0001$). Ačkoliv dvoucestná analýza rozptylu neprokázala rozdíl mezi skupinami v celkové aktivitě, párové srovnání odhalilo signifikantní rozdíl mezi skupinami v průměrné aktivitě v LD 3 (Sidak-Bonferroni test; $P = 0,0014$; obr. 19B). Metodou dvoucestná ANOVA byl také odhalen významný rozdíl mezi oběma skupinami v postupném obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě (2W ANOVA: $F[1,8] = 10,56$; $P = 0,0117$) a tím potvrzen rychlejší návrat lokomoční aktivity na původní úroveň u zvířat, kterým byl LPS aplikován v denních hodinách (ZT6), oproti zvířatům, kterým byl LPS aplikován v noci (ZT15).

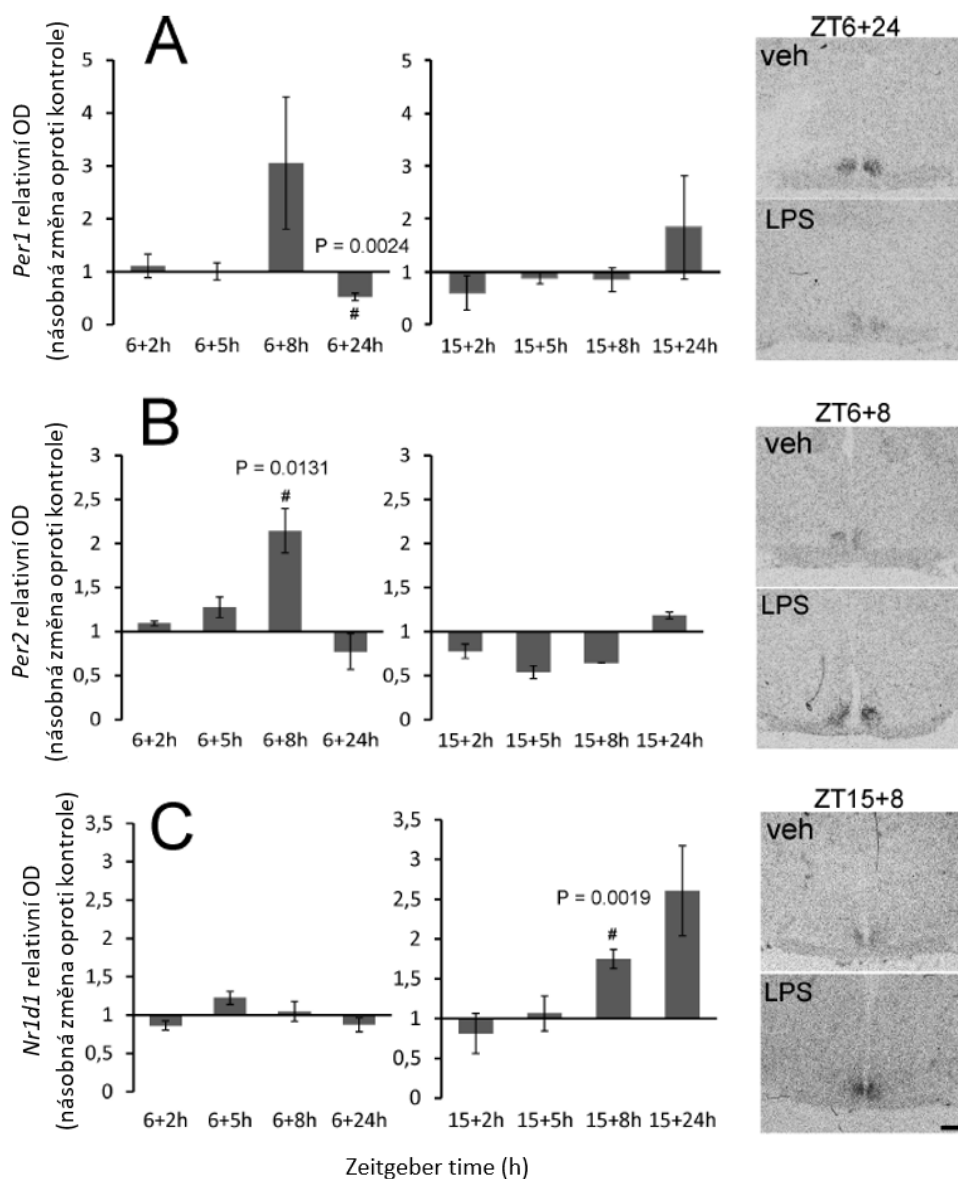


Obr. 19: Obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě trvá déle, když je zvířatům injekčně podán LPS během noci. (A) Změny v lokomoční aktivitě 1 den před (LD -1) a 8 dní po (LD 1 – LD 8) aplikaci LPS (1 mg/kg) v ZT6 (červená) nebo v ZT15 (černá), lokomoční aktivita v den aplikace LPS (LD 0) není znázorněna. Rytmus v pohybové aktivitě zaznamenaný senzorem je znázorněn přerušovanou čarou a proložen kosinusovou křivkou (plná čára). Nad diagramem jsou uvedeny signifikantní rozdíly v amplitudách získané metodou dvoucestná ANOVA. **(B)** Průměrný počet záznamů pohybu zvířete zaznamenaný senzorem za den je vyjádřený jako celková aktivita zvířete za den. Pomalejší navrácení do původního vzorce aktivity je pozorováno u skupiny zvířat s injekčně aplikovaným LPS v ZT15 ve srovnání se skupinou zvířat s injekční aplikací LPS v ZT6. **(C)** Reprezentativní aktogramy (záznamy pohybové aktivity) zvířat s aplikací LPS v ZT6 (vlevo; reálný čas aplikace LPS 12.00) a v ZT15 (vpravo; reálný čas aplikace LPS 21.00). Aplikace LPS je znázorněna červenými šipkami.

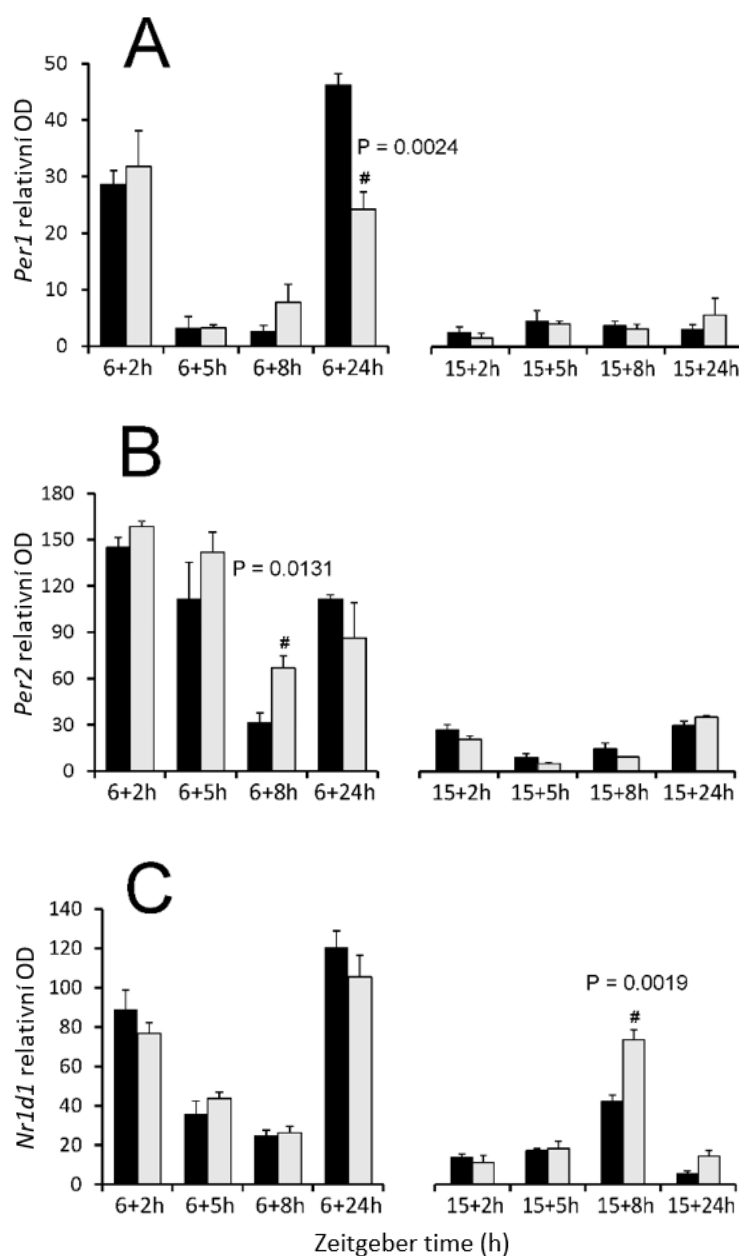
6.2.2. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* v závislosti na čase aplikace

V hodinovém mechanismu nejlépe odrážejí okamžité změny ve vnějším prostředí geny *Per1*, *Per2* a *Nr1d1*. Testovali jsme, zda akutní aplikace LPS může ovlivnit hodinový mechanismus v SCN a jestli se případný účinek liší v závislosti na čase podání LPS. K rozlišení přímého účinku LPS od bazální transkripce hodinových genů byla data vynesena jako násobný rozdíl relativní optické density specifického hybridizačního signálu mezi skupinou ovlivněnou LPS a kontrolní skupinou (obr. 20). Reálné hodnoty jsou pak znázorněné na obr. 21. Na obr. 20A je patrné významné snížení exprese mRNA *Per1* po 24 hodinách od aplikace LPS v ZT6 (1W ANOVA: $P = 0,0024$), zatímco u genu *Per2* bylo pozorováno významné zvýšení jeho exprese po 8 hodinách od aplikace LPS v ZT6 (1W ANOVA: $P = 0,0131$; obr. 20B). Po aplikaci LPS v ZT15 nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v expresi mRNA hodinových genů *Per1* a *Per2* v porovnání s kontrolami. Oproti tomu byla pozorována zvýšená exprese mRNA *Nr1d1* po 8 hodinách

od aplikace LPS v ZT15 (1W ANOVA: $P = 0,0019$), zatímco po aplikaci v ZT6 nedocházelo k významné změně exprese tohoto hodinového genu (obr. 20C).



Obr. 20: Účinek akutně systémově aplikovaného LPS na expresi hodinových genů v SCN potkana. Dospělým potkanům byl intraperitoneální injekcí aplikován LPS (1 mg/kg) v čase ZT6 nebo v ZT15 a mozky byly ihned vyjmuty z lebky v časových bodech 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po systémové aplikaci LPS. Úroveň exprese Per1 (**A**), Per2 (**B**) a Nr1d1 (**C**) mRNA byla určena z intenzity hybridizačního signálu a je vyjádřena jako násobný rozdíl relativní optické density (OD) mezi skupinou ovlivněnou LPS a kontrolní skupinou. Každý sloupec reprezentuje průměr ze 4 hodnot \pm SEM. # P – hodnota získaná mnohonásobným porovnáváním s následným Sidak-Bonferroni testem. Reprezentativní autoradiografické otisky koronálních řezů v oblasti SCN ukazují statisticky významné rozdíly v expresi Per1, Per2 a Nr1d1 mRNA u kontrolních zvířat (veh – vehikulum, fyziologický roztok) a u zvířat po systémové aplikaci LPS. Měřítka = 500 μ m.

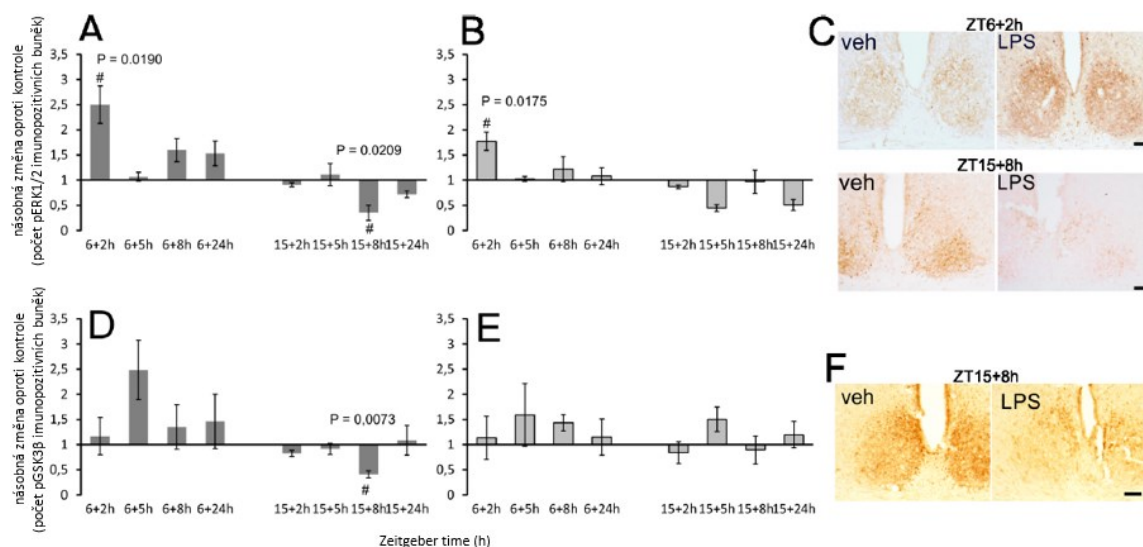


Obr. 21: Účinek akutně systémově aplikovaného LPS na expresi hodinových genů v SCN potkana. Dospělým potkanům byl intraperitoneální injekcí aplikován LPS (1 mg/kg) v čase ZT6 nebo v ZT15 a mozky byly ihned vyjmuty z lebky v časových bodech 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po systémové aplikaci LPS (šedé sloupce). K oběma skupinám s aplikovaným LPS byly vytvořeny odpovídající kontrolní skupiny (černé sloupce). Úroveň exprese *Per1* (A), *Per2* (B) a *Nr1d1* (C) mRNA byla určena z intenzity hybridizačního signálu a je znázorněna reálnými hodnotami relativní optické density (OD). Každý sloupec reprezentuje průměr ze 4 hodnot \pm SEM. #P – hodnota získaná mnohonásobným porovnáváním s následným Sidak-Bonferroni testem.

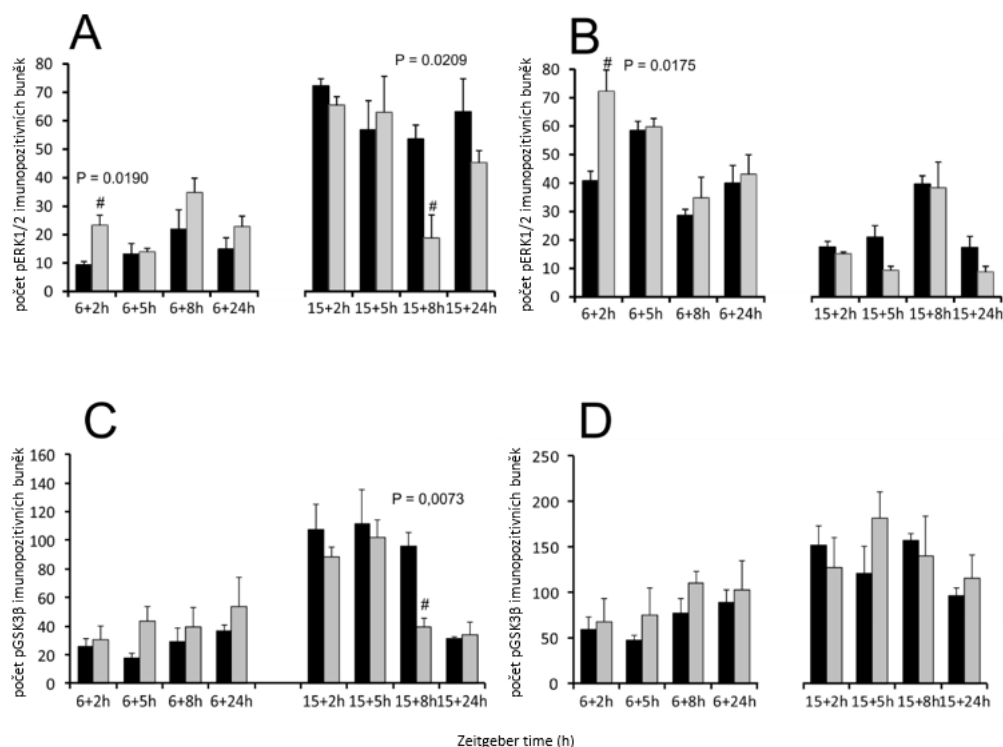
6.2.3. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni hladiny proteinů pERK1/2 a pGSK3β v závislosti na čase aplikace

Je známo, že fosforylované formy kináz ERK1/2 a GSK3β vykazují významný cirkadiánní rytmus a specifickou expresi v SCN (Coogan a Piggins, 2003; Iitaka et al., 2005; Lee et al., 2003; Pačesová et al., 2015). pERK1/2 a pGSK3β hrají role ve stabilizaci hodinového mechanismu a světelné synchronizaci a mohou být dokonce zapojeny ve STAT3 signalizaci (Beurel a Jope, 2008; Beurel a Jope, 2009). Zjišťovali jsme, zda akutně aplikovaný LPS může ovlivnit aktivaci těchto kináz a zda se účinek liší v závislosti na čase podání LPS. Pro odlišení účinku LPS od bazální hladiny fosforylovaných forem kináz byla data vynesena jako násobný rozdíl v počtu imunopozitivních buněk mezi skupinou ovlivněnou LPS a kontrolní skupinou (obr. 22). Reálné hodnoty počtu imunopozitivních buněk jsou znázorněny na obr. 23 a byly hodnoceny zvlášť v SCN rozděleném na vlSCN a dmSCN. Z obr. 22 je patrné, že akutně aplikovaný LPS v dávce 1 mg/kg vyvolal opačný účinek na hladinu proteinu pERK1/2 v závislosti na době aplikace. LPS aplikovaný v ZT6 významně indukoval pERK1/2 ve vlSCN 2 hodiny po aplikaci (1W ANOVA: $P = 0,0190$; obr. 22A a 23A) a podobně také v dmSCN 2 hodiny po aplikaci LPS (1W ANOVA: $P = 0,0175$; obr. 22B a 23B). LPS aplikovaný v ZT15 signifikantně snížil počet imunopozitivních buněk pERK1/2 ve vlSCN po 8 hodinách od aplikace LPS (1W ANOVA: $P = 0,0209$; obr. 22A a 23A), zatímco v dmSCN neindukoval žádné významné změny v hladině pERK1/2 (obr. 22B a 23B).

LPS aplikovaný v ZT6 neindukoval významné změny v hladinách pGSK3β v žádném z časových bodů, ačkoliv v průměru byla pozorována přinejmenším 1,4násobně vyšší hladina pGSK3β u skupin zvířat se systémově aplikovaným LPS než u skupin kontrolních ($1,4648 \pm 0,1691$; obr. 22D a 22E). LPS aplikovaný v ZT15 signifikantně snížil počet imunopozitivních buněk pGSK3β ve vlSCN po 8 hodinách od aplikace LPS (1W ANOVA: $P = 0,0073$; obr. 22D a 23C), avšak v dmSCN neindukoval významné změny v hladině proteinu pGSK3β (obr. 22E a 23D).



Obr. 22: Účinek akutně systémově aplikovaného LPS na hladinu fosforylovaných kináz ERK1/2 (A, B) a GSK3β (D, E) v SCN potkana. Dospělým potkanům byl intraperitoneální injekcí aplikován LPS (1 mg/kg) v čase ZT6 nebo v ZT15 a zvířata byla intrakardiálně perfundována v časových bodech 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po systémové aplikaci LPS. Počet imunopozitivních buněk pERK1/2 a pGSK3β byl vyjádřen samostatně pro ventrolaterální (A, D) a dorsomediální (B, E) část SCN a jako násobný rozdíl v počtu imunopozitivních buněk mezi skupinou ovlivněnou LPS a kontrolní skupinou. Každý sloupec reprezentuje průměr ze 4 hodnot \pm SEM. #P – hodnota získaná mnohonásobným porovnáváním s následným Sidak-Bonferroni testem. Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů v oblasti SCN ukazují statisticky významné rozdíly v intenzitě a distribuci proteinů pERK1/2 (C) a pGSK3β (F) u kontrolních zvířat (veh – vehikulum, fyziologický roztok) a u zvířat po systémové aplikaci LPS. Měřítka = 200 μ m.

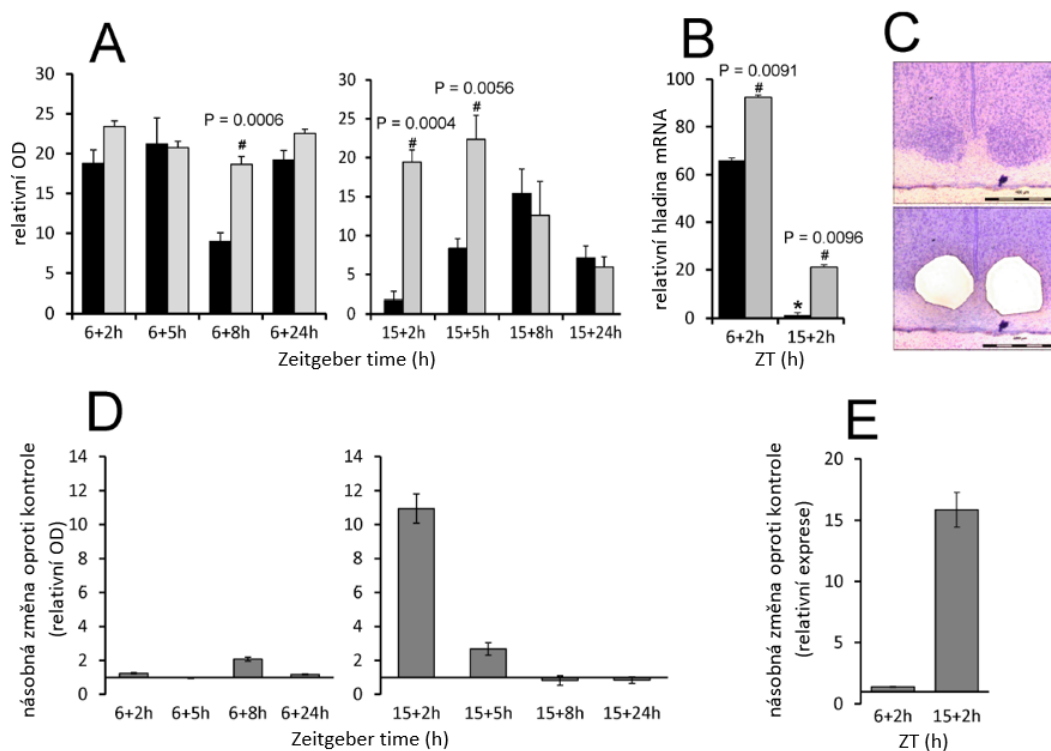


Obr. 23: Účinek akutně systémově aplikovaného LPS na hladinu fosforylovaných kináz ERK1/2 (A, B) a GSK3β (C, D) v SCN potkana. Dospělým potkanům byl intraperitoneální injekcí aplikován LPS (1 mg/kg) v čase ZT6 nebo v ZT15 a zvířata byla intrakardiálně perfundována v časových bodech 2 hodiny, 5 hodin, 8 hodin a 24 hodin po systémové aplikaci LPS (šedé sloupce). K oběma skupinám s aplikovaným LPS byly vytvořeny odpovídající kontrolní skupiny (černé sloupce). Počet imunopozitivních buněk pERK1/2 a pGSK3β byl vyjádřen samostatně pro ventrolaterální (A, C) a dorsomediální (B, D) část SCN a zázorně reálnými hodnotami počtu imunopozitivních buněk. Každý sloupec reprezentuje průměr ze 4 hodnot \pm SEM. #P – hodnota získaná mnohonásobným porovnáváním s následným Sidak-Bonferroni testem.

6.2.4. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na změny v úrovni exprese Stat3 v závislosti na čase aplikace

Pro odhalení účinku akutně aplikovaného LPS na expresi Stat3 mRNA byla zvířatům aplikována intraperitoneálně injekce LPS (1 mg/kg) v ZT6 (v čase, kdy je endogenní exprese Stat3 na vzestupu) a v ZT15 (v čase minimální exprese Stat3 v SCN, obr. 16). Metoda *in situ* hybridizace odhalila, že aplikovaný LPS během dne významně nemění expresi Stat3 mRNA do 8 hodin od podání (1W ANOVA: $P = 0,0006$), zatímco LPS aplikovaný v ZT15 způsobí výraznou indukci Stat3 mRNA 2 hodiny (1W ANOVA: $P = 0,0004$) a 5 hodin (1W ANOVA: $P = 0,0056$) po aplikaci (obr. 24A). LPS aplikovaný v ZT15 indukoval Stat3 mRNA 11násobně oproti kontrole 2 hodiny po aplikaci LPS ($11 \pm 0,86$) a téměř 3násobně po 5 hodinách od aplikace LPS ($2,7 \pm 0,37$; obr. 24D). Toto pozorování z *in situ* hybridizace bylo ověřeno navíc metodou RT-PCR na vzorcích SCN

izolovaných laserovou mikrodisekcí (obr. 24B a C). Metoda mnohonásobného porovnávání s následným Sidak-Bonferroni testem ukázala signifikantní zvýšení exprese *Stat3* mRNA po aplikaci LPS v obou časových bodech (ZT6: $P = 0,0091$; ZT15: $P = 0,0096$). LPS aplikovaný v ZT6 indukoval expresi *Stat3* mRNA pouze 1,4násobně ($1,417 \pm 0,1598$) oproti kontrole, zatímco LPS aplikovaný v ZT15 zvýšil expresi *Stat3* mRNA téměř 16násobně ($15,8 \pm 2,6$) oproti kontrole (obr. 24E). Tento výsledek se tedy shoduje s výsledkem získaným metodou *in situ* hybridizace a potvrzuje, že exprese *Stat3* mRNA vykazuje vyšší indukci po aplikaci LPS v noci. Signifikantní rozdíl mezi kontrolními skupinami ve dne a noci ($P < 0,0001$; obr. 24B) poukazuje na denní a noční rozdíl v expresi *Stat3* mRNA, který byl zjištěn *in situ* hybridizací (obr. 16).



Obr. 24: Změny v expresi *Stat3* mRNA v SCN potkana indukované intraperitoneálním podáním LPS.

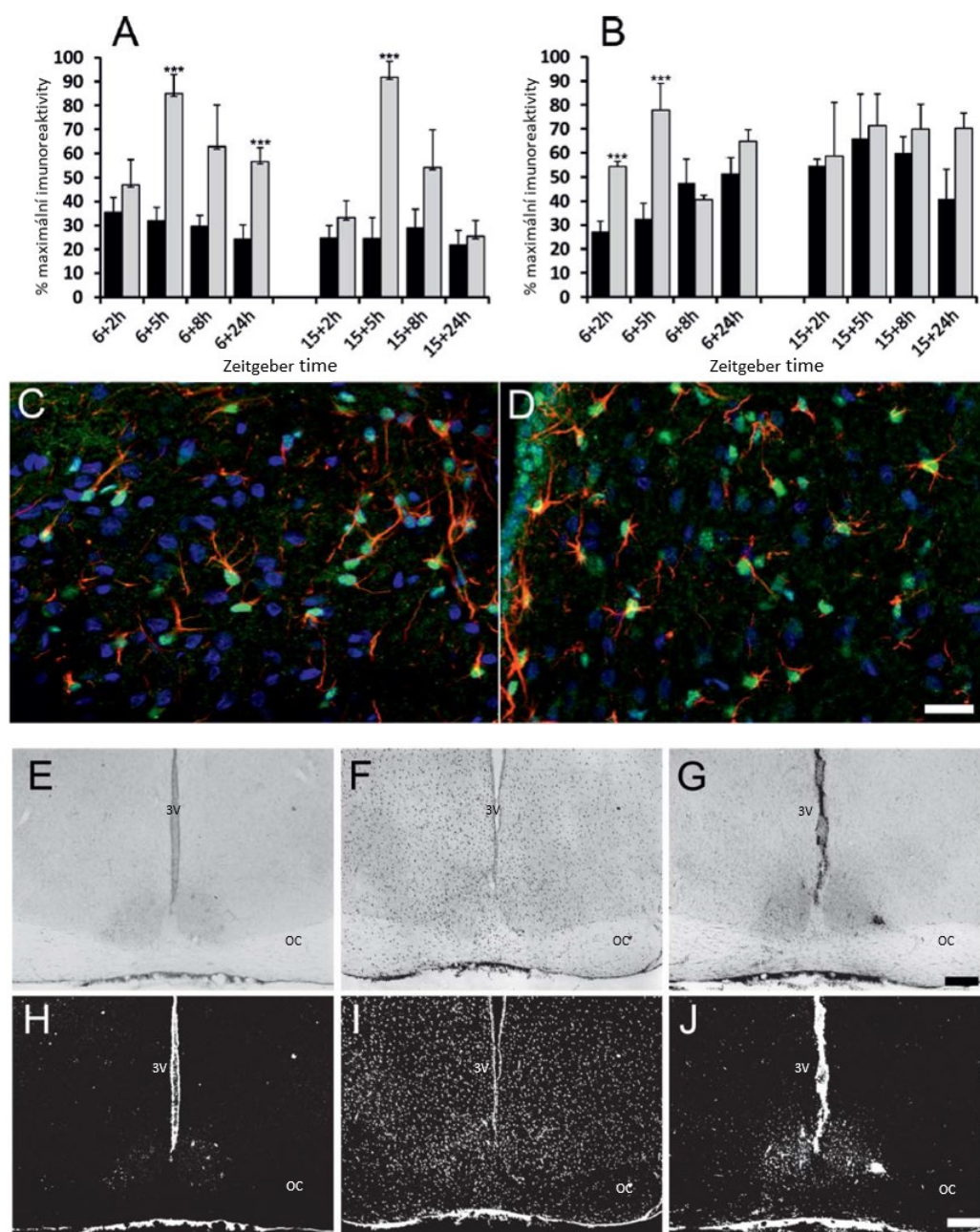
Dospělým potkanům byl aplikován LPS (1 mg/kg) v čase ZT6 nebo v ZT15 (šedé sloupce), kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok (černé sloupce). (A) Úroveň exprese *Stat3* byla určena z intenzity hybridizačního signálu. Každý sloupec reprezentuje průměr ze 4 hodnot \pm SEM. (B) Exprese *Stat3* byla stanovena metodou kvantitativní RT-PCR, normalizované hodnoty byly převedeny na procenta maximální hodnoty transkriptu. Každý bod reprezentuje průměr \pm SEM ze 3 zvířat. #P – hodnota získaná mnohonásobným porovnáváním s následným Sidak-Bonferroni testem. (C) Reprezentativní mikrofotografie koronálních řezů v oblasti SCN demonstrující oblast izolovanou laserovou mikrodisekcí. Měřítko = 400 μ m. (D, E) Data z A a B jsou vynesena jako násobek změny *Stat3* mRNA indukované LPS oproti kontrole a ukazují přímý účinek LPS bez ohledu na denní oscilace genů, OD – optická densita.

6.2.5. Vliv intraperitoneálně aplikované injekce LPS na hladiny fosforylovaných forem proteinu STAT3

Akutní aplikace LPS v dávce 1 mg/kg indukovala fosforylaci proteinu STAT3 (pSTAT3(Y) a pSTAT3(S)) především v astrocytech a v závislosti na denní době (obr. 25), avšak na fosforylaci proteinů STAT5 neměla stejná dávka LPS žádný účinek (data nejsou zobrazena). LPS aplikovaný v ZT6 indukoval signifikantní zvýšení v hladinách pSTAT3(Y) během 5 hodin (1W ANOVA: $F[7] = 58,887$; $P < 0,01$) a zvýšená hladina byla pozorována i po 24 hodinách od aplikace LPS (1W ANOVA: $F[7] = 22,555$; $P < 0,01$, obr. 25A). Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní efekt času (2W ANOVA: $F[1,36] = 42,830$; $P < 0,0001$), LPS ($F[3,36] = 3,024$; $P = 0,0421$) a interakce ($F[3,36] = 3,069$; $P = 0,0400$). Párové srovnání (Sidak-Bonferroni test) ukázalo, že efekt času se lišil mezi 2 a 5 hodinami ($P = 0,0015$) a také se signifikantně lišil mezi 5 a 24 hodinami ($P = 0,0104$) po aplikaci LPS. Oproti tomu LPS aplikovaný v ZT15 indukoval zvýšenou hladinu pSTAT3(Y) po 5 hodinách od aplikace (1W ANOVA: $F[7] = 38,457$; $P < 0,01$), avšak po 24 hodinách od aplikace LPS se hladina pSTAT3(Y) opět navrátila na hladinu shodnou s kontrolami (obr. 25A). Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní efekt času (2W ANOVA: $F[1,36] = 37,700$; $P < 0,0001$), LPS ($F[3,36] = 13,040$; $P < 0,0001$) a interakce ($F[3,36] = 11,551$; $P < 0,0001$). Metoda párového srovnání (Sidak-Bonferroni test) prokázala rozdílný efekt času mezi 2 a 5 hodinami ($P = 0,0001$) od aplikace LPS, rozdílný efekt času byl pozorovaný také mezi 5 a 8 hodinami ($P = 0,0201$) a mezi 5 a 24 hodinami ($P < 0,0001$) od aplikace LPS. Po 5 a 8 hodinách od aplikace LPS v ZT6 byl imunohistochemický signál pSTAT3(Y) rozprostřený v rámci celého hypotalamu bez zřejmého strukturního vymezení, zatímco 24 hodin od aplikace LPS se imunohistochemický signál nacházel výhradně v SCN a nebyl detekován v okolní tkáni (obr. 25E-J). Po aplikaci LPS v ZT15 nebyl pozorován podobný efekt, imunohistochemický signál jednoduše vymizel ze SCN ve stejnou dobu, kdy vymizel z okolní tkáně.

Hladina pSTAT3(S) byla významně zvýšena 2 hodiny (1W ANOVA: $F[7] = 63,757$; $P < 0,01$) a 5 hodin (1W ANOVA: $F[7] = 24,903$; $P < 0,01$) po aplikaci LPS v ZT6, zatímco LPS aplikovaný v ZT15 neměl na hladinu pSTAT3(S) žádný efekt (obr. 25B). Dvoucestná ANOVA odhalila signifikantní efekt času (2W ANOVA: $F[1,36] = 35,012$; $P < 0,0001$), LPS ($F[3,36] = 6,462$; $P = 0,0023$) a interakce ($F[1,36] = 11,000$; $P < 0,0001$). Párové srovnání (Sidak-Bonferroni test) ukázalo, že efekt času se významně

lišil mezi 2 a 5 hodinami ($P = 0,0252$), dále byl signifikantně rozdílný mezi 2 a 8 hodinami ($P = 0,0004$), mezi 5 a 8 hodinami ($P = 0,0032$) a mezi 8 a 24 hodinami ($P = 0,0005$) po aplikaci LPS. Z kolokalizačních experimentů pSTAT3(Y) a pSTAT3(S) s markerem astrocytů (GFAP) a DAPI (4'6-diamidin-2-fenylindol) je patrné, že obě fosforylované formy proteinu STAT3 byly indukovány v SCN především v astrocytech a lokalizovány především v jádře (obr. 25C, D).



Obr. 25: Indukce fosforylace STAT3 v SCN aplikací LPS. A, B: Počet pSTAT3(Y; A) a pSTAT3(S; B) imunopozitivních buněk u kontrolních skupin (černé sloupce) a u skupin po intraperitoneálním podání LPS v ZT6 nebo ZT15 (šedé sloupce) 2, 5, 8 a 24 hodin od aplikace LPS. Data jsou vynesena jako procento maximální hodnoty v každém imunohistochemickém stanovení. Každý sloupec reprezentuje průměr \pm SEM ze 4-6 zvířat. *** $P < 0,01$, 1W ANOVA. **C, D:** Mikrofotografie vlSCN ve velkém zvětšení ukazuje kolokalizaci pSTAT3(Y; C, zelená) a pSTAT3(S; D, zelená) indukovaných LPS s GFAP (červená) v jednotlivých buňkách (modře jsou obarvena jádra DAPI). **E-J:** Reprezentativní mikrofotografie koronálního řezu mediálním SCN s detekcí pSTAT3(Y) u kontrolních zvířat (E, H), u zvířat 5 hodin po aplikaci LPS v ZT6 (F, I) a zvířat 24 hodin po aplikaci LPS v ZT6 (G, J). Měřítko = 50 μ m (C, D), měřítko = 200 μ m (E-J), 3V – 3. mozková komora, OC – optické chiasma.

7. Diskuze

Cílem této disertační práce bylo studium proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B v SCN potkana a jejich možného zapojení v interakci cirkadiálního s imunitním systémem. Nejprve jsme sledovali změny v hladinách těchto proteinů za fyziologických podmínek v průběhu 24hodinového cyklu a zaměřili jsme se na jejich lokalizaci v jednotlivých buněčných typech SCN. Poté jsme zjišťovali, jestli *Stat3* vykazuje rytmickou expresi také na úrovni mRNA. Dále jsme zkoumali, zda intraperitoneální aplikace LPS v dávce 1 mg/kg vyvolává také změny v expresi *Stat3* a indukuje fosforylaci proteinů STAT3 a STAT5 v SCN v závislosti na době aplikace. Nejprve jsme však zjišťovali, sledováním lokomoční aktivity, jestli má intraperitoneální aplikace LPS v závislosti na době podání vliv také na behaviorální rytmus u potkana a jestli také vyvolává změny v molekulárním mechanismu cirkadiálních oscilací, a to na úrovni exprese hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* a v hladinách proteinů pERK1/2 a pGSK3β v SCN potkana.

V první části práce jsme se zabývali proteiny STAT v SCN za fyziologických podmínek. Z našich publikovaných výsledků je patrné, že na světelném režimu LD 12:12 jsou hladiny obou izoform proteinu STAT5 (STAT5A a STAT5B) vysoké podobně jako hladina proteinu STAT3, která navíc vykazuje denní oscilace s nízkou, ale statisticky významnou amplitudou. Dále jsme ukázali, že také exprese *Stat3* mRNA vykazuje cirkadiální rytmus v SCN v podmínkách stále tmy (světelný režim DD) s vyšší úrovní exprese ve dne a nižší v noci, a tento pokus potvrdil, že rytmické změny *Stat3* v SCN jsou řízeny cirkadiálními hodinami a nejsou jen pasivním odrazem střídání světla a tmy. Metaanalýza promotorových oblastí různých genů naznačila, že by mohl být transkripční faktor STAT3 řízen hlavním molekulárním mechanismem a považován tedy za CCG (Bozek et al., 2009). Rytmická exprese *Stat3* byla také potvrzena v krvi u lidí (Lech et al., 2016) nebo v obloukových jádrech hypotalamu u myši (Agapito et al., 2014). Naše studie je však první, která popisuje rytmickou expresi *Stat3* v SCN. V pozdější práci jsme znovu potvrdili rytmickou expresi *Stat3* v SCN a ukázali také jeho rytmus v pineální žláze (Kubištová et al., 2020). Dosud nejvýznamnější práce týkající se signalizace JAK/STAT v SCN popisuje cirkadiální rytmus v expresi *Socs1* a *Socs3*, supresorů cytokinové signalizace u myši s nejnižší úrovní exprese v časně noci a nejvyšší expresí v pozdní noci (Sadki et al., 2007). Proteiny SOCS3 jsou nejdůležitější a nejvíce prozkoumané negativní regulátory signální dráhy JAK/STAT, které inhibují katalytickou aktivitu JAK, a tím

zabraňují fosforylaci proteinu STAT3 (Sasaki et al., 1999). Také je známo, že exprese *Socs3* je závislá na aktivovaném STAT3 (Ernst et al., 2009; Howard et al., 2004). Naším primárním cílem nebylo zkoumat proteiny SOCS v SCN. Z našich výsledků je však zřejmé, že bazální hladiny obou fosforylovaných forem STAT3 jsou nízké a nerytmické, což může naznačovat, že za kontrolních podmínek cirkadiánní změny v expresi SOCS pravděpodobně neovlivňují signalizaci STAT3 závislou na fosforylaci a také, že za těchto podmínek pSTAT3 významně neovlivňuje hladinu SOCS v SCN.

S použitím kolokalizačních experimentů proteinů STAT3, STAT5A a STAT5B s markerem astrocytů GFAP jsme odhalili expresi a lokalizaci STAT3 a STAT5A, ale nikoliv STAT5B, v astrocytech SCN. Lokalizace STAT3 v astrocytech je velmi dobře známa (Gautron et al., 2002; Harré et al., 2003). Vzhledem k naší pozorované lokalizaci proteinu STAT3 výhradně v astrocytech se můžeme domnívat, že k rytmické expresi *Stat3* dochází také v astrocytech. Dosud však bylo provedeno jen velmi málo studií ukazujících odlišnou lokalizaci proteinů STAT5A a STAT5B v různých buněčných typech v hypothalamu, neboť většina prací se zabývá lokalizací proteinů STAT5 obecně, bez rozlišování izoform A a B (Lee et al., 2008; Lerant et al., 2001; Mütze et al., 2007). Dosud nebyla publikována žádná práce zabývající se výhradně expresí proteinu STAT5A v neuronech, zatímco několik málo prací ukázalo jadernou lokalizaci a význam STAT5B v neuronech hypothalamu (Bennett et al., 2005; Ma et al., 2005). Ačkoliv v naší práci neukazujeme přímo kolokalizaci proteinů STAT5B s markery neuronů, jeho exprese výhradně v jiných buňkách než těch, které exprimují GFAP podporuje předpoklad, že STAT5B je neuronálního původu také v SCN. Již dříve byla pozorována jaderná lokalizace proteinů STAT5 v hypothalamu nejen v neuronech, ale také v malé míře v astrocytech (Mütze et al., 2007). Jelikož nebyly v uvedené studii zkoumány odděleně obě izoformy STAT5, můžeme usuzovat na rozdílnou lokalizaci izoform STAT5A a STAT5B v buněčných typech, podobně, jako jsme pozorovali v našem případě v SCN. Navíc propojení signální dráhy STAT5B s glutamatergní neurotransmisí v neuronech poukazuje na možnou interakci STAT5 s cirkadiánním systémem (Guido et al., 1999; Chao et al., 2012; Peng et al., 2010).

V druhé části práce jsme se věnovali vlivu akutně aplikovaného LPS na změny v cirkadiánním systému potkana, a to jak na úrovni behaviorální, tak na úrovni molekulární. V našich experimentech jsme použili LPS v dávce 1 mg/kg, což je dávka, u které bylo prokázáno, že potlačuje expresi základních hodinových genů v SCN potkana

a tím může docházet ke změnám funkce SCN (Okada et al., 2008). Protože je dobře známo, že reakce na patogen je závislá na čase infekce (Halberg et al., 1960), načasovali jsme aplikaci LPS do dvou časových bodů, jeden časový bod aplikace LPS byl v polovině světelné části dne (ZT6) a druhý v době časné noci (ZT15). Denní čas aplikace LPS byl určen na shodnou dobu, ve které je pozorována vysoká hladina proteinu STAT3 a také genová exprese *Per1*, *Per2* a *Nr1d1* (Moravcová et al., 2016; Shearman et al., 1997), abychom zjistili, zda LPS může snižovat expresi těchto hodinových genů. Noční čas aplikace LPS se naopak překrýval s nízkými úrovněmi genové exprese vybraných transkriptů a sloužil pro měření možné indukce genové exprese v odpovědi na zánětlivou reakci vyvolanou LPS.

Účinkem LPS na různé aspekty cirkadiánní fyziologie v závislosti na době aplikace se zabývalo několik vědeckých skupin. Například Marpegán s kolegy (2009) pozorovali signifikantně zvýšenou mortalitu u myší po aplikaci LPS v dávce 20 mg/kg na konci dne (ZT11) oproti aplikaci v druhé části noci (ZT19). V jiné studii bylo zjištěno, že LPS aplikovaný opakovaně v dávce 200 µg/kg vykazuje u potkanů zvýšenou toleranci po aplikaci ve dne ve srovnání s noční aplikací (Franklin et al., 2007). Toto zjištění naznačuje, že opakovaná expozice patogenu je lépe tolerovaná organismem, když nastane během klidové části dne. Pokud bychom rozšířili toto zjištění na člověka, znamenalo by to, že denní doba, kdy dojde k infekci, může ovlivnit závažnost a trvání symptomů, zejména v případech opětovného vystavení patogenu. LPS v nízké dávce (25 µg/kg) způsobuje fázové zpoždění v pohybové aktivitě myší po aplikaci v době časné subjektivní noci (CT15), v jiných časových bodech nemá na lokomoční aktivitu žádný významný účinek (Marpegán et al., 2005). Abychom zjistili, zda LPS opravdu působí na SCN, sledovali jsme nejprve rytmus v lokomoční aktivitě potkana po systémovém podání LPS, který je řízen z SCN a je považován za jeden ze základních markerů funkce cirkadiánního pacemakeru. Snížení lokomoční aktivity je navíc jedním z markerů tzv. „sickness“ chování, tj. komplexu behaviorálních projevů, ke kterým obvykle dochází po infekci (Hart, 1988). Největší snížení lokomoční aktivity potkanů bylo podle očekávání pozorováno ihned následující den po denní i noční aplikaci LPS, ale postupné obnovení lokomoční aktivity nastávalo rychleji, když byl LPS aplikován potkanům během dne v porovnání s aplikací LPS v době noci. Celková aktivita potkana a amplituda rytmu se navracela do původního stavu také rychleji po aplikaci LPS v době dne. Z našich výsledků je tedy patrné, že rychlost obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě je závislá na

čase podání LPS. Již dříve bylo pozorováno snížení lokomoční aktivity první den po bakteriální infekci (LPS, 1 mg/kg), která však nastala na počátku klidové fáze potkana (ZT1) a obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě bylo pozorováno již třetí den po infekci (Okada et al., 2008). Intraperitoneální injekce LPS v dávce 5 mg/kg myším v polovině dne (ZT6 až ZT8) vedla k úplné ztrátě aktivity monitorované v běhacím kolečku až po 4 dny (O'Callaghan et al., 2012). Dále bylo zjištěno, že LPS kromě významného snížení lokomoční aktivity může také působit fázové posuny rytmu v aktivitě. K fázovému zpoždění v pohybové aktivitě myši dochází po aplikaci 50 a 100 µg/kg LPS v časně subjektivní noci (CT15; Paladino et al., 2010; Paladino et al., 2014). Přestože je dobře známo, že citlivost organismu k zánětlivému stimulu je ovlivněna denní dobou, a tedy cirkadiánními hodinami, některé ze studií jsou dosud prováděny pouze za určité denní doby. Námi pozorované rychlejší obnovení rytmu v lokomoční aktivitě po aplikaci LPS ve dne než v noci, a tedy denní rozdíly organismu v reakci na infekci, odpovídá také denním rozdílům pozorovaným například po infekci prvokem *Leishmania major* (Kiessling et al., 2017). Zásadní práce z roku 2014 ukázala, že aplikace LPS na začátku noci (ZT14) zvyšuje plasmatickou hladinu cytokinů IL-6 a TNF-α a také neuronální aktivitu SCN ve srovnání s aplikací LPS na začátku dne (ZT2; Guerrero-Vargas et al., 2014). Snížená reakce organismu k infekci v době dne ve srovnání s infekcí v době noci může být vysvětlena tím, že vyšší noční hladiny indukovaných prozánětlivých cytokinů vedou k horšímu průběhu nemoci nebo k pomalejšímu uzdravení.

V další části práce jsme se zabývali účinky LPS na molekulární hodinový mechanismus v SCN. Zaměřili jsme se na expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Rev-erba* účastnících se jak primární, tak i sekundární transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky. Regulace exprese hodinových genů *Per* je hlavním mechanismem, kterým světelné či nesvětelné podněty přizpůsobují cirkadiánní fázi vnějšímu času (Akiyama et al., 1999; Albrecht et al., 1997). Je známo, že různé nesvětelné podněty aplikované v době subjektivního dne snižují expresi genů *Per1* a *Per2* (Fukuhara et al., 2001; Horikawa et al., 2000; Maywood et al., 1999). Naším cílem bylo zjistit, jestli také LPS aplikovaný v různou denní dobu mění expresi hodinových genů. První práce týkající se účinku systémově aplikovaného LPS na expresi *Per* genů v SCN nezaznamenala žádné změny v expresi těchto genů po aplikaci 50 µg/kg LPS v ZT22, tedy v pozdní noci (Takahashi et al., 2001). V jiné studii se však ukázalo, že systémová aplikace LPS v dávce 1 mg/kg

na začátku dne (ZT1) signifikantně snižuje expresi *Per2* v SCN první den po aplikaci LPS, a na původní hodnoty se exprese navrácí již druhý den (Okada et al., 2008). V našich experimentech jsme pozorovali mírné zvýšení exprese hodinového genu *Per2* po 8 hodinách a snížení exprese *Per1* 24 hodin po injekci LPS v polovině dne (ZT6). Žádné významné změny v expresi hodinových genů *Per* jsme nezaznamenali po aplikaci LPS v časně noci (ZT15), což je podobné předchozímu pozorování po systémové aplikaci LPS v ZT22 (Takahashi et al., 2001). Dále také LPS podaný intraperitoneální injekcí myším v dávce 100 µg/kg v ZT15 nemění expresi *Per1* 90 minut po aplikaci, ale zvyšuje počet buněk pozitivních na PER2 150 minut od aplikace LPS v celém SCN (Paladino et al., 2014). LPS vazbou na TLR4 aktivuje signální dráhu vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů. O cytokinech je také známo, že mění expresi hodinových genů v SCN (Duhart et al., 2013). Snížená exprese *Per1* a *Per2* byla také pozorována 24 hodin od aplikaci cytokinu TNF- α v myších fibroblastech a lidských synoviálních buňkách (Cavadini et al., 2007; Yoshida et al., 2013). Naproti tomu, významné zvýšení genové exprese *Per1* a *Per2* bylo popsáno 1 hodinu po stimulaci kultury fibroblastů cytokinem TNF- α (Petrzilka et al., 2009). Beynon a Coogan (2010) navíc zjistili, že LPS aplikovaný myším v dávce 5 mg/kg v polovině dne (ZT5), tedy v téměř stejnou dobu, jako probíhala aplikace LPS v naší studii, zvyšuje expresi podjednotky p65 transkripčního faktoru NF- κ B a také hladiny okamžitého časného genu *c-Fos* v SCN pouze po 24 hodinách od aplikace. V našich výsledcích jsme také pozorovali významné ovlivnění exprese *Per1* pouze po 24 hodinách od aplikace LPS. Naše zjištění o tom, jak LPS moduluje expresi hodinových genů *Per*, tedy nejsou v rozporu s předchozími pozorováními a spolu s výše zmíněnými studiemi zdůrazňují význam krátkodobé ale také 24hodinové odpovědi cirkadiálních hodin na zánětlivou denní stimulaci.

O účinku LPS na genovou expresi *Nr1d1* v SCN je dosud publikována pouze jedna studie. Ta popisuje vliv prenatálně aplikovaného LPS na změny v hlavním oscilátoru v SCN během ontogenetického vývoje (Spišská et al., 2020). Z našich výsledků vyplývá, že LPS vede k signifikantnímu zvýšení v expresi *Nr1d1* v SCN pouze po 8 hodinách od aplikace LPS v době časně noci (ZT15). Aplikace LPS v denní době (ZT6) neměla na expresi *Nr1d1* žádný významný vliv. Proteinovým produktem hodinového genu *Nr1d1* je jaderný receptor REV-ERB α , u něhož bylo prokázáno funkční propojení s imunitním systémem a je považován za významný regulátor neuroinflamace (Gibbs et al., 2012; Griffin et al., 2019). REV-ERB α snižuje expresi genů pro cytokiny

Il-6 a *Ccl2*, jejichž transkripce je zvýšena aplikací LPS (Griffin et al., 2019; Sato et al., 2014a; Sato et al., 2014b). REV-ERB α je tedy schopný zmenšit rozsah akutního zánětu regulací tvorby prozánětlivých cytokinů. O tom, zda námi pozorované zvýšení genové exprese *Nr1d1* 8 hodin po aplikaci LPS ovlivňuje také expresi a hladiny IL-6 nebo *Ccl2* v SCN, lze spekulovat. *Ccl2* vykazuje v SCN cirkadiánní rytmus s maximem exprese v druhé polovině noci (ZT19) a tato hladina klesá již v ZT23 (Duhart et al., 2016), což je doba, ve které jsme pozorovali zvýšenou expresi *Nr1d1* po aplikaci LPS v noci. Cytokin *Ccl2* může být indukován již hodinu po aplikaci LPS, a tak námi pozorovaná později zvýšená exprese *Nr1d1* může přispívat k hodinami řízenému snížení hladiny *Ccl2*. Podobný mechanismus byl již navržen pro roli REV-ERB α v makrofázích (Gibbs et al., 2012).

Dále jsme sledovali, zda akutní aplikace LPS povede také ke změnám v hladinách fosforylovaných forem ERK1/2 a GSK3 β , které se sice nepodílí přímo na generování cirkadiánních rytmů, ale fosforylační produktů hodinových genů mohou ovlivňovat hlavní molekulární mechanismus. Z literatury je známo, že proteinové hladiny pERK1/2 vykazují v SCN rytmus a ve vlSCN a dmSCN oscilují v antifázi (Pačesová et al., 2015). Naše výsledky poukazují na zvýšenou hladinu pERK1/2 ve vlSCN i dmSCN po 2 hodinách od aplikace LPS ve dne (ZT6) a sníženou hladinu ve vlSCN 8 hodin po aplikaci LPS v časně noci (ZT15). Podobně byla také pozorována zvýšená hladina pERK1/2 ve vlSCN i dmSCN po 2 hodinách po denní aplikaci (ZT7) morfinu. Aplikace morfinu v časně noci (ZT15) vedla k významnému snížení hladiny pERK1/2 ve vlSCN již během 2 hodin od aplikace (Pačesová et al., 2015). pERK1/2 může být indukována ve vlSCN v řádu minut světelným pulzem v době subjektivní noci (Červená et al., 2015; Obrietan et al., 1998). Aplikace světelného pulzu v CT15 vedla k bezprostřednímu zvýšení hladiny pERK1/2, avšak po 1 hodině od pulzu se hladina vrátila na původní úroveň a poté dále klesá. Pokles pERK1/2 o téměř polovinu byl pozorovaný i po 8 hodinách po pulzu (Červená et al., 2015). Také jsou známy práce popisující modulaci hladiny pERK1/2 v hypotalamu po stimulaci LPS, ne však přímo v SCN. Například Singru s kolegy (2008) zjistili významně zvýšenou hladinu pERK1/2 v PVN potkana 2 hodiny po intraperitoneální aplikaci LPS v první polovině dne. Účinky LPS na proteinové hladiny pERK1/2 jsou také demonstrovány *in vitro*. Aplikace LPS zvyšuje hladinu pERK1/2 například v makrofázích a osteoblastech myši (Daigang et al., 2016; Chen a Wang, 1999; Rawadi et al., 1998). Také se ukázalo, že REV-ERB α snižuje fosforylaci ERK1/2

v makrofázích, a to i po stimulaci LPS (Sato et al., 2014b), což je v souladu s našimi pozorováními, neboť kromě snížené hladiny pERK1/2 8 hodin po aplikaci LPS v noci jsme současně zaznamenali zvýšenou expresi *Nr1d1* genu.

Dále jsme studovali změny v hladinách kinázy pGSK3 β . Podobně jako u pERK1/2 jsme pozorovali sníženou hladinu pGSK3 β ve vlSCN 8 hodin po aplikaci LPS v noci. Aplikace LPS ve dne neměla na hladinu pGSK3 β žádný významný vliv. V SCN je popsán cirkadiánní rytmus v hladinách pGSK3 β , který se neliší průběhem ve vlSCN a dmSCN (Iitaka et al., 2005; Pačesová et al., 2015). Snížená hladina pGSK3 β byla dříve pozorována ve vlSCN také již 2 hodiny po noční aplikaci morfinu (ZT15) a světelném pulzu na začátku subjektivní noci (CT15). Hladina pGSK3 β přetrvávala snížená i 4 hodiny od aplikace morfinu, ale zvýšila se po 8 hodinách od světelného pulzu (Červená et al., 2015; Pačesová et al., 2015). Z literatury je známo, že GSK3 β je aktivní v defosforylovaném stavu. GSK3 β fosforyluje proteiny PER2 a CRY2 a přispívá tím k jejich jaderné translokaci a proteasomální degradaci (Iitaka et al., 2005; Kurabayashi et al., 2006). Navíc, pravděpodobně kooperací se STAT3, napomáhá GSK3 β k tvorbě prozánětlivých cytokinů, které vznikají při zánětu, například po aplikaci LPS (Beurel a Joep, 2009; Green a Nolan, 2012). Noční aplikace LPS a následné krátkodobé zvýšení aktivity GSK3 β může proto přispívat ke změnám v hladinách cytokinů v noci a přechodné zvýšení fosforylace hodinových proteinů kinázou GSK3 β může měnit dynamiku hodinového mechanismu a tím se podílet na udržování stability hodinové smyčky v SCN.

Námi pozorované změny v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Nr1d1* a hladinách pERK1/2 a pGSK3 β v SCN jsou relativně mírné, avšak signifikantní. Jak je z našich výsledků patrné, nejvíce významných změn v SCN nastalo asi 8 hodin po infekci. V té době byla zvýšená genová exprese *Per2* po denní aplikaci LPS a zároveň *Nr1d1* po noční aplikaci LPS. Také jsme pozorovali sníženou hladinu pERK1/2 i pGSK3 β , která poukazuje na zvýšení aktivity nefosforylované GSK3 β , 8 hodin po noční aplikaci LPS. Kromě těchto změn po 8 hodinách od aplikace LPS jsme pozorovali rychlou změnu v hladině pERK1/2 ve vlSCN, která nastala během 2 hodin a, podobně jako další autoři (Cavadini et al., 2007; Yoshida et al., 2013), sníženou expresi hodinového genu *Per1* 24 hodin po denní aplikaci LPS. Co se týče hodinového mechanismu, námi pozorované změny v expresi hodinových genů 8 hodin po aplikaci LPS by měly vést k fázovým posunům cirkadiánních oscilací a podobně také zvýšení hladiny aktivní

GSK3 β může vést k fázovému předběhnutí (Iitaka et al., 2005; Osland et al., 2011). Je tedy možné, že tyto mírné změny v hodinovém mechanismu odráží to, jak se SCN vyrovnává s akutním patologickým prostředím a pomáhají vyvažovat možné poruchy ve výstupních rytmech.

V poslední části práce jsme se věnovali studiu proteinů STAT3 v SCN po aplikaci LPS. Je známo, že STAT3 hraje rozmanité role v mnoha buněčných typech, například hraje významnou roli v reaktivitě astrocytů v odpovědi na patologické podmínky v nervové tkáni (Ceyzériat et al., 2016), ale nejvíce je známý jako regulátor zánětlivé odpovědi a nádorového bujení (Rummel, 2016; Yu et al., 2014). Zde jsme sledovali, zda aplikace LPS v různou denní dobu způsobuje změny na úrovni exprese *Stat3*, a také na úrovni fosforylace proteinu STAT3. Z našich výsledků je patrné, že aplikace LPS v ZT15 zvýšila expresi *Stat3* více než 10krát již 2 hodiny po aplikaci LPS. Zvýšení exprese *Stat3* po 2 hodinách od aplikace LPS v ZT6 bylo metodou *in situ* hybridizace pouze naznačeno, signifikantní změna byla prokázána až citlivější metodou RT-PCR, která dokáže rozlišit i nepatrné rozdíly. Také jsme metodou RT-PCR zjistili významný rozdíl v expresi *Stat3* mRNA u kontrolních zvířat mezi dnem a nocí, což odpovídá námi zjištěnému profilu *Stat3* získanému pomocí *in situ* hybridizace s vyšší úrovní exprese ve dne a nižší v průběhu noci. Je proto možné, že vysoká fyziologická denní exprese *Stat3* může omezovat další zvýšení *Stat3* po aplikaci LPS ve dne, a naopak exprese *Stat3* mRNA může být výrazněji indukována po aplikaci LPS v noci zřejmě kvůli nízké endogenní *Stat3* mRNA v noci. Více než 15krát zvýšená exprese *Stat3* mRNA nad endogenní hladinu, kterou jsme naměřili po aplikaci LPS v noci, by mohla ovlivňovat produkci cytokinů a velikost zánětlivé odpovědi v SCN a STAT3 by mohl sloužit jako propojující článek imunitního s cirkadiánním systémem.

Významným výsledkem této práce je pozorování, že aplikace LPS indukuje fosforylaci proteinu STAT3 v SCN na obou aminokyselinových zbytcích, tedy jak na tyrosinu na pozici 705, která je nezbytná pro dimerizaci a vazbu STAT3 na DNA sekvence v jádře, tak na serinu na pozici 727 a tato fosforylace může být zprostředkována různými kinázami, včetně ERK1/2, serin/threoninové kinázy mTOR, proteinkinázy C δ a mitogenem a stresem aktivované proteinkinázy MSK1 (Gkouveris et al., 2014; Jain et al., 1999; Schuringa et al., 2001b; Wierenga et al., 2003; Yokogami et al., 2000). V různých částech mozku a konkrétně také v hypothalamu byla aktivace STAT3 a jeho translokace do jádra po intraperitoneální injekci LPS pozorována již dříve (Gautron et al., 2002; Hosoi

et al., 2004; Yamawaki et al., 2010), avšak ne přímo v SCN. Naše výsledky ukazují, že LPS indukuje v astrocytech SCN fosforylaci STAT3 na tyrosinu na pozici 705 během dne i v noci 5 hodin po systémové aplikaci LPS a indukce fosforylace přetrvává i 24 hodin od aplikace LPS ve dne. Naproti tomu, indukce fosforylace STAT3 na serinu na pozici 727 nastala v SCN pouze po denní aplikaci LPS, a to již po 2 hodinách a přetrvávala 5 hodin po aplikaci LPS ve dne. Poté již došlo ke snížení hladiny pSTAT3(S) na bazální endogenní úroveň. Tyto rozdílné odpovědi ve fosforylaci STAT3 v SCN po systémové aplikaci LPS v různou denní dobu mohou být vlastností samotného cirkadiálního pacemakeru. Jaderná translokace proteinu STAT3 vyžaduje fosforylaci na Tyr705 a byla pozorována již dříve v různých strukturách mozku po intraperitoneální aplikaci LPS a tato translokace nastala během 4 hodin od aplikace LPS a poklesla po 8 hodinách od aplikace LPS (Gautron et al., 2002). Podobný průběh fosforylace a jaderné translokace jsme pozorovali také po denní aplikaci LPS v okolní tkáni, která obklopuje SCN. Z našich výsledků je dále patrné, že fosforylace STAT3 na tyrosinu, na rozdíl od okolní tkáně, přetrvává i 24 hodin po aplikaci LPS ve dne. Prodloužená zvýšená hladina pSTAT3(Y) v odpovědi na LPS se zdá být typickou a unikátní vlastností astrocytů SCN. Podobný 24hodinový účinek byl již naznačen v SCN po denní aplikaci LPS několika předchozími studiemi. Například Beynon a Coogan (2010) pozorovali 24 hodin po aplikaci LPS ve dne (ZT5) významně zvýšené hladiny podjednotky p65 transkripčního faktoru NF- κ B a také okamžitého časného genu *c-Fos* v SCN. Okada s kolegy (2008) zjistili sníženou expresi hodinového genu *Per2* a CCG *Dbp* v SCN, která nastává také pouze první den po aplikaci LPS během dne.

Již dříve bylo zjištěno, že LPS aktivuje STAT3 především v astrocytech (Gautron et al., 2002; Harré et al., 2003). V naší studii jsme podobně, jak bylo zmíněno již výše, s využitím kolokalizačních experimentů ukázali kromě lokalizace endogenního STAT3 také zvýšenou fosforylaci a jadernou lokalizaci STAT3 po aplikaci LPS v astrocytech SCN. Námi studovaný protein STAT3, jehož vysokou hladinu jsme pozorovali v astrocytech SCN, může být součástí signální dráhy, prostřednictvím které astrocyty SCN předávají informace o zánětlivých procesech neuronům SCN, vzhledem k tomu, že čím dál více studií poukazuje na roli astrocytů SCN ve zprostředkovávání imunitních signálů v reakci na zánětlivou stimulaci (Duhart et al., 2013; Duhart et al., 2016; Leone et al., 2006). Například je známo, že stimulace prozánětlivým cytokinem TNF- α vede ke změnám v expresi hodinových genů v astrocytech SCN a k sekreci *Ccl2*, TNF- α a IL-6

astrocyty SCN *in vitro* (Duhart et al., 2013). Dále bylo zjištěno, že chemokin Ccl2 hraje také roli v odpovědi SCN na stimulaci LPS (Duhart et al., 2016). Použití kondiciovaného média z astrocytů stimulovaných TNF- α navíc ovlivňuje expresi hodinových genů v buněčné linii fibroblastů NIH 3T3 a jeho aplikace intracerebroventrikulárně vede k fázovému posunu v lokomoční aktivitě myši (Duhart et al., 2013). To naznačuje, že fázové zpoždění pozorované po aplikaci LPS by mohlo být zprostředkováno také astrocyty (Marpegán et al., 2005). TNF- α se váže na dva typy receptorů, TNFR typu 1 (TNFR1) a TNFR2. Za výše popsané účinky TNF- α je pravděpodobně odpovědný TNFR1, neboť patří mezi převládající typ TNFR v astrocytech (Dopp et al., 1997). Dále bylo zjištěno, že TNFR1 interakcí s JAK2 indukuje fosforylaci STAT3 na serinu 727 (Guo et al., 1998; Pincheira et al., 2008). O tom, jestli se TNFR1 spolu s JAK2 podílejí také na námi pozorované serinové fosforylaci STAT3 po aplikaci LPS ve dne můžeme pouze spekulovat, neboť exprese *Tnfr1* je v SCN vysoká na začátku noci (Paladino et al., 2014), ale o dynamice translace a hladině proteinů není nic známo a aktivita JAK2 v savcích SCN nebyla dosud studována. Serinová i tyrosinová fosforylace proteinu STAT3 v astrocytech může však být zahájena aktivací purinergních receptorů P2Y vazbou ATP (Washburn a Neary, 2006). Tyto purinergní receptory byly také popsány v SCN, podobně jako další typ purinergních receptorů P2X (Bhattacharya et al., 2013), jejichž stimulace však vede pouze k fosforylaci STAT3 na tyrosinu (Washburn a Neary, 2006). Jestli P2Y receptory přispívají také ke zvýšené fosforylaci STAT3 na serinu v SCN při denní stimulaci LPS můžeme pouze odhadovat. Navíc je známo, že astrocyty SCN generují cirkadiánní rytmy v uvolňování ATP (Svobodová et al., 2018) a aplikace ATP k organotypickým kulturám SCN moduluje synaptickou aktivitu neuronů v SCN (Bhattacharya et al., 2013). Tvorba ATP se však významně snižuje v astrocytech s podmíněnou delecí STAT3 (Sarafian et al., 2010). Kromě toho je také fosforylace STAT3 v astrocytech indukována v odpovědi na traumatické poranění mozku vedoucí nejen k astroglióze ale také k akutnímu zánětu mozku (O'Callaghan et al., 2014). Aktivace STAT3 signalizace v astrocytech tedy hraje roli v ochraně nervové tkáně před neurotoxicitou (Herrmann et al., 2008; Sarafian et al., 2010). Je možné, že zvýšená hladina proteinu STAT3 a jeho aktivace fosforylací na obou aminokyselinových zbytcích po denní stimulaci LPS odpovídá vyšší denní aktivitě astrocytů SCN (Leone et al., 2006), což může vést k účinnější ochraně cirkadiánních hodin během dne a může být příčinou rozdílu v odpovědi SCN na aplikaci LPS ve dne a v noci. Můžeme se tedy pouze

domnívat, že aktivace proteinu STAT3 v astrocytech SCN po stimulaci LPS ovlivňuje neurony SCN a tím i hodinový mechanismus.

Z výše uvedeného je zřejmé, že existuje spousta studií, které se zaměřují na zkoumání účinků systémového zánětu na různé aspekty cirkadiánní fyziologie (Duhart et al., 2013; Duhart et al., 2016; Guerrero-Vargas et al., 2014; Leone et al., 2006; Leone et al., 2012; Marpegán et al., 2005; Okada et al., 2008; Paladino et al., 2010; Paladino et al., 2014). Dosud však není známa kompletní signální dráha zodpovědná za působení LPS na hlavní cirkadiánní oscilátor v SCN. Dosud bylo prokázáno, že účinky systémově aplikovaného LPS na cirkadiánní systém jsou zprostředkovány vazbou LPS na TLR4 (Paladino et al., 2010) a významný vliv má také cytokin TNF- α (Paladino et al., 2014). Dále byla prokázána exprese transkripčního faktoru NF- κ B v astrocytech SCN a jeho aktivace aplikací LPS i prozánětlivými cytokiny (Leone et al., 2006). Vazba LPS na TLR4 indukuje fosforylaci na tyrosinu JAK2 v makrofázích (Okugawa et al., 2003). JAK2 však dosud nebyla v SCN studována. Tato kináza se podílí na aktivaci proteinu STAT3 v astrocytech fosforylací tyrosinu na pozici 705 (Sriram et al., 2004). Lokalizace pSTAT3 po aplikaci LPS byla pozorována v astrocytech v různých částech mozku (Gautron et al., 2002). Je tedy možné, že protein STAT3 je v SCN zapojen v signální dráze, která je aktivována vazbou LPS a tato zjištění naznačují možné zapojení astrocytů SCN při zprostředkovávání informací neuronům SCN po zánětlivé stimulaci.

8. Závěr

Tato disertační práce vznikla na základě dvou publikovaných studií zabývajících se proteiny STAT v SCN potkana a jejich reakcí na stimulaci imunitního systému. Jako modulační agens pro aktivaci imunitního systému byl použit LPS v dávce 1 mg/kg, neboť bylo zjištěno, že tato dávka vyvolává nejen změny ve výstupních rytmech v lokomoční aktivitě, ale také v expresi hodinových genů v SCN (Okada et al., 2008).

V našich studiích jsme ukázali denní rytmus proteinu STAT3 v astrocytech SCN potkana s nízkou, avšak signifikantní amplitudou, s maximální hladinou v ranních hodinách a minimem na začátku noci. Dále jsme jako první pozorovali a popsali také cirkadiánní rytmus v genové expresi *Stat3* v SCN potkana s maximální expresí ve dne a minimální expresí v noci. Také jsme odhalili vysoké, avšak nerytmické hladiny proteinu STAT5A v astrocytech a proteinu STAT5B v neastrogliálních buňkách SCN.

Po akutně aplikovaném LPS ve dne (ZT6) i v noci (ZT15) jsme zaznamenali výrazně sníženou lokomoční aktivitu potkanů první den po aplikaci. Postupné obnovení amplitudy rytmu v lokomoční aktivitě bylo rychlejší u potkanů injikovaných LPS ve dne. V závislosti na době aplikace LPS jsme také pozorovali mírné přechodné změny v expresi hodinových genů *Per1*, *Per2* a *Nr1d1* a v hladinách proteinů pERK1/2 a pGSK3 β v SCN potkana. Dále jsme odhalili významně zvýšenou genovou expresi *Stat3* již 2 hodiny po akutní aplikaci LPS ve dne i v noci, avšak s rozdílnou velikostí. Kromě toho jsme také po denní akutní aplikaci LPS pozorovali indukci fosforylace STAT3 jak na tyrosinu, tak na serinu. Hladina pSTAT3(Y) zůstala zvýšená i 24 hodin po denní aplikaci, zvýšená hladina pSTAT3(S) byla pozorována nejdéle 5 hodin od aplikace LPS ve dne. Po aplikaci LPS v noci jsme pozorovali rychlou indukci fosforylace pouze na tyrosinu, která poklesla do 8 hodin od aplikace LPS v noci.

Tyto výsledky naznačují, že biologické hodiny hrají důležitou roli v odpovědi na systémovou zánětlivou stimulaci a že citlivost organismu k LPS může být ovlivněna cirkadiánním systémem, a tedy odpověď organismu může být odlišná, pokud je LPS aplikován v průběhu dne nebo noci. Námi pozorované změny v expresi *Stat3* a indukci fosforylace proteinu STAT3 v SCN po systémové aplikaci LPS poukazují na možnou roli STAT3 v astrocytech SCN při komunikaci imunitních signálů neuronům SCN.

9. Seznam použité literatury

- Aaronson, D. S., Horvath, C. M. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*; 296:5573; 1653-1655.
- Abrahamson, E. E., Moore, R. Y. 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*; 916:1-2; 172-191.
- Abrahamson, E. E., Leak, R. K., Moore, R. Y. 2001. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *NeuroReport*; 12:2; 435-440.
- Ackermann, K., Revell, V. L., Lao, O., Rombouts, E. J., Skene, D. J., Kayser, M. 2012. Diurnal rhythms in blood cell populations and the effect of acute sleep deprivation in healthy young men. *Sleep*; 35:7; 933-940.
- Agapito, M. A., Zhang, C., Murugan, S., Sarkar, D. K. 2014. Fetal alcohol exposure disrupts metabolic signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons via a circadian mechanism in male mice. *Endocrinology*; 155:7; 2578-2588.
- Agostino, P. V., Plano, S. A., Golombek, D. A. 2008. Circadian and pharmacological regulation of casein kinase I in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Journal of Genetics*; 87:5; 467-471.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., Nishida, E. 2002. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells. *Molecular and Cellular Biology*; 22:6; 1693-1703.
- Akashi, M., Hayasaka, N., Yamazaki, S., Node, K. 2008. Mitogen-activated protein kinase is a functional component of the autonomous circadian system in the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neuroscience*; 28:18; 4619-4623.
- Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X. J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., Kishimoto, T. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*; 77:1; 63-71.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., Shibata, S. 1999. Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *The Journal of Neuroscience*; 19:3; 1115-1121.
- Albers, H. E., Ferris, C. F. 1984. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience Letters*; 50:1-3; 163-168.
- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., Lee, Ch. Ch. 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*; 91:7; 1055-1064.
- Albrecht, U. 2012. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*; 74:2; 246-60.

- Arjona, A., Sarkar, D. K. 2005. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. *The Journal of Immunology*; 174:12; 7618-7624.
- Aronin, N., Sagar, S. M., Sharp, F. R., Schwartz, W. J. 1990. Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 87:15; 5959-5962.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., Shuai, K. 2003. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *The Journal of Biological Chemistry*; 278:24; 21327-21330.
- Asai, M., Yoshinobu, Y., Kaneko, S., Mori, A., Nikaido, T., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S. 2001. Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. *Journal of Neuroscience Research*; 66:6; 1133-1139.
- Aschoff, J., Fatranska, M., Giedke, H., Doerr, P., Stamm, D., Wisser, H. 1971. Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science*; 171:3967; 213-215.
- Aton, S. J., Colwell, Ch. S., Harmar, A. J., Waschek, J., Herzog, E. D. 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*; 8:4; 476-483.
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*; 93:6; 929-937.
- Baumann, A., Gönnerwein, S., Bischoff, S. C., Sherman, H., Chapnik, N., Froy, O., Lorentz, A. 2013. The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology*; 140:4; 465-474.
- Bedel, R., Thiery-Vuillemin, A., Grandclement, C., Balland, J., Remy-Martin, J. P., Kantelip, B., Pallandre, J. R., Pivot, X., Ferrand, C., Tiberghien, P., Borg, C. 2011. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Research*; 71:5; 1615-1626.
- Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M., Vinkemeier, U. 2000. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97:19; 10418-10423.
- Belle, M. D. C., Hughes, A. T. L., Bechtold, D. A., Cunningham, P., Pierucci, M., Burdakov, D., Piggins, H. D. 2014. Acute suppressive and long-term phase modulation actions of orexin on the mammalian circadian clock. *The Journal of Neuroscience*; 34:10; 3607-3621.
- Bennett, E., McGuinness, L., Gevers, E. F., Thomas, G. B., Robinson, I. C. A. F., Davey, H. W., Luckman, S. M. 2005. Hypothalamic STAT proteins: regulation of somatostatin neurones by growth hormone via STAT5b. *Journal of Neuroendocrinology*; 17:3; 186-194.

- Benveniste, E. N. 1997. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chemical Immunology*; 69; 31-75.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*; 295:5557; 1070-1073.
- Besing, R. C., Paul, J. R., Hablitz, L. M., Rogers, C. O., Johnson, R. L., Young, M. E., Gamble, K. L. 2015. Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*; 30:2; 155-160.
- Beurel, E., Jope, R. S. 2008. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *Journal of Biological Chemistry*; 283:32; 21934-21944.
- Beurel, E., Jope, R. S. 2009. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *Journal of Neuroinflammation*; 6:9; 1-11.
- Beynon, A. L., Coogan, A. N. 2010. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1 β and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiology International*; 27:8; 1546-1563.
- Bhattacharya, S., Eckner, R., Grossman, S., Oldread, E., Arany, Z., D'Andrea, A., Livingston, D. M. 1996. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon- α . *Nature*; 383:6598; 344-347.
- Bhattacharya, A., Vavra, V., Svobodova, I., Bendova, Z., Vereb, G., Zemkova, H. 2013. Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *The Journal of Neuroscience*; 33:18; 8035-8044.
- Biello, S. M., Janik, D., Mrosovsky, N. 1994. Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*; 62:1; 273-279.
- Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M., Fehm, H. L. 1997. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *The Journal of Immunology*; 158:9; 4454-4464.
- Bozek, K., Relógio, A., Kielbasa, S. M., Heine, M., Dame, Ch., Kramer, A., Herzog, H. 2009. Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLOS One*; 4:3; 1-12.
- Brancaccio, M., Patton, A. P., Chesham, J. E., Maywood, E. S., Hastings, M. H. 2017. Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamatergic signaling. *Neuron*; 93:6; 1420-1435.
- Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., Schibler, U. 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology*; 12:18; 1574-1583.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenen, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., Bradfield, Ch. A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*; 103:7; 1009-1017.

- Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., Gamble, K. L., Johnson, R. L., Besing, R. C., Menaker, M., Gewirtz, A. T., Davidson, A. J. 2010. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *The Journal of Immunology*; 185:10; 5796-5805.
- Cavadini, G., Petrzilka, S., Kohler, P., Jud, C., Tobler, I., Birchler, T., Fontana, A. 2007. TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104:31; 12843-12848.
- Ceyzériat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M. A., Ben Haim, L., Escartin, C. 2016. The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience*; 330; 205-218.
- Collum, R. G., Brutsaert, S., Lee, G., Schindler, Ch. 2000. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97:18; 10120-10125.
- Colwell, Ch. S., Foster, R. G., Menaker, M. 1991. NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Research*; 554:1-2; 105-110.
- Colwell, Ch. S. 2000. Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurobiology*; 43:4 379-388.
- Coogan, A. N., Piggins, H. D. 2003. Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *The Journal of Neuroscience*; 23:7; 3085-3093.
- Coogan, A. N., Wyse, C. A. 2008. Neuroimmunology of the circadian clock. *Brain Research*; 1232; 104-112.
- Crumbley, Ch., Wang, Y., Kojetin, D. J., Burris, T. P. 2010. Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a Rev-erba/RORa target gene. *The Journal of Biological Chemistry*; 285:46; 35386-35392.
- Červená, K., Pačesová, D., Spišská, V., Bendová, Z. 2015. Delayed effect of the light pulse on phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β kinases in the ventrolateral suprachiasmatic nucleus of rat. *Journal of Molecular Neuroscience*; 56:2; 371-376.
- Daan, S., Pittendrigh, C. S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*; 106:3; 253-266.
- Daigang, L., Jining, Q., Jinlai, L., Pengfei, W., Chuan, S., Liangku, H., Ding, T., Zhe, S., Wei, W., Zhong, L., Kun, Z. 2016. LPS-stimulated inflammation inhibits BMP-9-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between BMP/MAPK and Smad signaling. *Experimental Cell Research*; 341:1; 54-60.
- Damiola, F., Minh, N. L., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*; 14:23; 2950-2961.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakazato, M. 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides,

interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96:2; 748-753.

David, M., Petricoin, III., E., Benjamin, Ch., Pine, R., Weber, M. J., Larner, A. C. 1995a. Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science*; 269:5231; 1721-1723.

David, M., Chen, H. E., Goelz, S., Larner, A. C., Neel, B. G. 1995b. Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Molecular and Cellular Biology*; 15:12; 7050-7058.

DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., Reppert, S. M. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience*; 10:5; 543-545.

Dopp, J. M., Mackenzie-Graham, A., Otero, G. C., Merrill, J. E. 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *Journal of Neuroimmunology*; 75:1-2; 104-112.

Du, Y. Z., Fan, S. J., Meng, Q. H., Wang, G. Q., Tong, J. 2005. Circadian expression of clock and screening of clock-controlled genes in peripheral lymphocytes of rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 336:4; 1069-1073.

Duhart, J. M., Leone, M. J., Paladino, N., Evans, J. A., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A. J., Golombek, D. A. 2013. Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- α . *The Journal of Immunology*; 191:9; 4656-4664.

Duhart, J. M., Brocardo, L., Mul Fedeles, M. L., Guglielmotti, A., Golombek, D. A. 2016. CCL2 mediates the circadian response to low dose endotoxin. *Neuropharmacology*; 108; 373-381.

Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., Levy, D. E. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*; 84:3; 443-450.

Dziema, H., Oatis, B., Butcher, G. Q., Yates, R., Hoyt, K. R., Obrietan, K. 2003. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*; 17:8; 1617-1627.

Eide, J. E., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., Virshup, D. M. 2002. The circadian regulatory proteins BMAL1 and Cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . *The Journal of Biological Chemistry*; 277:19; 17248-17254.

Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., Virshup, D. M. 2005. Control of mammalian circadian rhythm by CKI ϵ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Molecular and Cellular Biology*; 25:7; 2795-2807.

Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N.,

- Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., Yoshimura, A. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*; 387:6636; 921-924.
- Ernst, M. B., Wunderlich, C. M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S. B., Kleinriders, A., Husch, A., Münzberg, H., Hampel, B., Alber, J., Kloppenburg, P., Brüning, J. C., Wunderlich, F. T. 2009. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *The Journal of Neuroscience*; 29:37; 11582-11593.
- Farajnia, S., Deboer, T., Rohling, J. H., Meijer, J. H., Michel, S. 2013. Aging of the suprachiasmatic clock. *The Neuroscientist*; 20:1; 44-55.
- Field, M. D., Maywood, E. S., O'Brien, J. A., Weaver, D. R., Reppert, S. M., Hastings, M. H. 2000. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*; 25:2; 437-447.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., O'Neill, L. A. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*; 413:6851; 78-83.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., Golenbock, D. T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of Experimental Medicine*; 198:7; 1043-1055.
- Fortier, E. E., Rooney, J., Dardente, H., Hardy, M. P., Labrecque, N., Cermakian, N. 2011. Circadian variation of the response of T cells to antigen. *The Journal of Immunology*; 187:12; 6291-6300.
- Franklin, A. E., Engeland, Ch. G., Kavaliers, M., Ossenkopp, K. P. 2007. The rate of behavioral tolerance development to repeated lipopolysaccharide treatments depends upon the time of injection during the light-dark cycle: a multivariable examination of locomotor activity. *Behavioural Brain Research*; 180:2; 161-173.
- Frontini, A., Bertolotti, P., Tonello, C., Valerio, A., Nisoli, E., Cinti, S., Giordano, A. 2008. Leptin-dependent STAT3 phosphorylation in postnatal mouse hypothalamus. *Brain Research*; 1215; 105-115.
- Fukuhara, Ch., Brewer, J. M., Dirden, J. C., Bittman, E. L., Tosini, G., Harrington, M. E. 2001. Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters*; 314:3; 119-122.
- Gallego, M., Eide, E. J., Woolf, M. F., Virshup, D. M., Forger, D. B. 2006. An opposite role for tau in circadian rhythms revealed by mathematical modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 103:28; 10618-10623.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, Ch., Kretz, O., Minh, N. L., Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H. W., Schütz, G. 2002. Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron*; 34:2; 245-253.

- Gautron, L., Lafon, P., Chaigniau, M., Tramu, G., Layé, S. 2002. Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience*; 112:3; 717-729.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., Weitz, Ch. J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*; 280:5369; 1564-1569.
- Gibbs, J. E., Blaikley, J., Beesley, S., Matthews, L., Simpson, K. D., Boyce, S. H., Farrow, S. N., Else, K. J., Singh, D., Ray, D. W., Loudon, A. S. I. 2012. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 109:2; 582-587.
- Ginty, D. D., Kornhauser, J. M., Thompson, M. A., Bading, H., Mayo, K. E., Takahashi, J. S., Greenberg, M. E. 1993. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*; 260:5105; 238-241.
- Givalois, L., Dornand, J., Mekaouche, M., Solier, M. D., Bristow, A. F., Ixart, G., Siaud, P., Assenmacher, I., Barbanel, G. 1994. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *American Journal of Physiology*; 267:1; 164-170.
- Gkouveris, I., Nikitakis, N., Karanikou, M., Rassidakis, G., Sklavounou, A. 2014. ERK1/2 activation and modulation of STAT3 signaling in oral cancer. *Oncology Reports*; 32:5; 2175-2182.
- Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., Levy, D. E. 2009. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science*; 324:5935; 1713-1716.
- Gough, D. J., Koetz, L., Levy, D. E. 2013. The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation. *PLOS One*; 8:11; 1-9.
- Green, H. F., Nolan, Y. M. 2012. GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia. *Neurochemistry International*; 31:5; 666-671.
- Griffin, P., Dimitry, J. M., Sheehan, P. W., Lananna, B. V., Guo, Ch., Robinette, M. L., Hayes, M. E., Cedeño, M. R., Nadarajah, C. J., Ezerskiy, L. A., Colonna, M., Zhang, J., Bauer, A. Q., Burris, T. P., Musiek, E. S. 2019. Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 116:11; 5102-5107.
- Guan, X. T., Lin, W. J., Tang, M. M. 2015. Comparison of stress-induced and LPS-induced depressive-like behaviors and the alterations of central proinflammatory cytokines mRNA in rats. *PsyCh Journal*; 4:3; 113-122.
- Guanizo, A. C., Fernando, C. D., Garama, D. J., Gough, D. J. 2018. STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors*; 36:1-2; 1-14.

- Gubin, D. G., Weinert, D., Rybina, S. V., Danilova, L. A., Solovieva, S. V., Durov, A. M., Prokopiev, N. Y., Ushakov, P. A. 2017. Activity, sleep and ambient light have a different impact on circadian blood pressure, heart rate and body temperature rhythms. *Chronobiology International*; 34:5; 632-649.
- Guerrero-Vargas, N. N., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. del C., García, J., Guzmán-Ruiz, M., Carrero, J. C., Escobar, C., Buijs, R. M. 2014. Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*; 273:1-2; 22-30.
- Guido, M. E., de Guido, L., Goguen, D., Robertson, H. A., Rusak, B. 1999. Differential effects of glutamatergic blockade on circadian and photic regulation of gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Molecular Brain Research*; 67:2; 247-257.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., Cermakian, N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by Rev-erb and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms*; 20:5; 391-403.
- Guissoni Campos, L. M., Buchaim, R. L., da Silva, N. C., Spilla, C. S. G., Hataka, A., Pinato, L. 2017. Suprachiasmatic nucleus and subordinate brain oscillators: clock gene desynchronization by neuroinflammation. *Neuroimmunomodulation*; 24:4-5; 231-241.
- Güldner, F. H. 1983. Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Experimental Brain Research*; 50:2-3; 373-376.
- Guo, D., Dunbar, J. D., Yang, C. H., Pfeffer, L. M., Donner, D. B. 1998. Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *The Journal of Immunology*; 160:6; 2742-2750.
- Gupta, S., Yan, H., Wong, L. H., Ralph, S., Krolewski, J., Schindler, Ch. 1996. The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN- α signals. *The EMBO Journal*; 15:5; 1075-1084.
- Hahnová, K., Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Kašparová, D., Žurmanová, J., Bendová, Z. 2016. Circadian Dexas1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiology International*; 33:2; 141-150.
- Halberg, F., Johnson, E. A., Brown, B. W., Bittner, J. J. 1960. Susceptibility rhythm to E. coli endotoxin and bioassay. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 103; 142-144.
- Hannibal, J., Ding, J. M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P. J., Gillette, M. U., Mikkelsen, J. D. 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *The Journal of Neuroscience*; 17:7; 2637-2644.
- Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., Fukada, Y. 2005. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β . *The Journal of Biological Chemistry*; 280:36; 31714-31721.

- Hastings, M. H., Duffield, G. E., Smith, E. J. D., Maywood, E. S., Ebling, F. J. P. 1998. Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiology International*; 15:5; 425-445.
- Harré, E. M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R., Hübschle, T. 2002. Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *Journal of Applied Physiology*; 92:6; 2657-2666.
- Harré, E. M., Roth, J., Gerstberger, R., Hübschle, T. 2003. Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Research*; 980:1; 151-155.
- Hart, B. L. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*; 12:2; 123-137.
- Hayashi, M., Shimba, S., Tezuka, M. 2007. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 30:4; 621-626.
- Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P. J., Mikkelsen, J. D. 2003. Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*; 25:4; 293-310.
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S., Sofroniew, M. V. 2008. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*; 28:28; 7231-7243.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., Nicola, N. A. 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95:1; 114-119.
- Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K., Nomura, M. 1998. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 250:1; 83-87.
- Horikawa, K., Yokota, S., Fuji, K., Akiyama, M., Moriya, T., Okamura, H., Shibata, S. 2000. Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *The Journal of Neuroscience*; 20:15; 5867-5873.
- Horng, T., Barton, G. M., Medzhitov, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature Immunology*; 2:9; 835-841.
- Horvath, C. M., Wen, Z., Darnell, Jr. J. E. 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & Development*; 9:8; 984-994.
- Horvath, C. M., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, Jr. J. E. 1996. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Molecular and Cellular Biology*; 16:12; 6957-6964.

- Hosoi, T., Okuma, Y., Kawagishi, T., Qi, X., Matsuda, T., Nomura, Y. 2004. Bacterial endotoxin induces STAT3 activation in the mouse brain. *Brain Research*; 1023:1; 48-53.
- Howard, J. K., Cave, B. J., Oksanen, L. J., Tzamelis, I., Bjørbaek, Ch., Flier, J. S. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nature Medicine*; 10:7; 734-738.
- Hrisca, M. L. 2005. Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1057:1; 403-430.
- Chao, H. W., Lai, Y. T., Lu, Y. L., Lin, Ch. I., Mai, W., Huang, Y. S. 2012. NMDAR signaling facilitates the IPO5-mediated nuclear import of CPEB3. *Nucleic Acids Research*; 40:17; 8484-8498.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P. Y., Stark, G. R. 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *The EMBO Journal*; 19:15; 4111-4122.
- Chaudhari, A., Gupta, R., Patel, S., Velingkaar, N., Kondratov, R. 2017. Cryptochromes regulate IGF-1 production and signaling through control of JAK2-dependent STAT5B phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*; 28:6; 834-842.
- Chen, M., Cheng, A., Chen, Y. Q., Hymel, A., Hanson, E. P., Kimmel, L., Minami, Y., Taniguchi, T., Changelian, P. S., O'Shea, J. J. 1997. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 94:13; 6910-6915.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, Jr. J. E., Kuriyan, J. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*; 93:5; 827-839.
- Chen, C. C., Wang, J. K. 1999. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Molecular Pharmacology*; 55:3; 481-488.
- Chen, Y. G., Mantalaris, A., Bourne, P., Keng, P., Wu, J. H. 2000. Expression of mPer1 and mPer2, two mammalian clock genes, in murine bone marrow. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 276:2; 724-728.
- Chen, W., Daines, M. O., Hershey, G. K. K. 2004. Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *The Journal of Immunology*; 172:11; 6744-6750.
- Chou, T. C., Bjorkum, A. A., Gaus, S. E., Lu, J., Scammell, T. E., Saper, C. B. 2002. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *The Journal of Neuroscience*; 22:3; 977-990.
- Chou, T. C., Scammell, T. E., Gooley, J. J., Gaus, S. E., Saper, C. B., Lu, J. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *The Journal of Neuroscience*; 23:33; 10691-10702.

- Chung, Ch. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*; 278:5344; 1803-1805.
- Chung, S., Son, G. H., Kim, K. 2011. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1812:5; 581-591.
- Ibuka, N., Kawamura, H. 1975. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Research*; 96:1; 76-81.
- Iitaka, Ch., Miyazaki, K., Akaike, T., Ishida, N. 2005. A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock. *The Journal of Biological Chemistry*; 280:33; 29397-29402.
- Inouye, S. T., Kawamura, H. 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic „island“ containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 76:11; 5962-5966.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, Ch. D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D. M., Penninger, J. M. 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*; 409:6818; 349-354.
- Ishida, Y., Yagita, K., Fukuyama, T., Nishimura, M., Nagano, M., Shigeyoshi, Y., Yamaguchi, S., Komori, T., Okamura, H. 2001. Constitutive expression and delayed light response of casein kinase I ϵ and I δ mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience Research*; 64:6; 612-616.
- Iwasaki, H., Kovacic, J. C., Olive, M., Beers, J. K., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Tonelli, L. H., Nabel, E. G. 2010. Disruption of protein arginine N-methyltransferase 2 regulates leptin signaling and produces leanness in vivo through loss of STAT3 methylation. *Circulation Research*; 107:8; 992-1001.
- Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, Jr. J. E., Murphy, K. M. 1995. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *Journal of Experimental Medicine*; 181:5; 1755-1762.
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W., Cao, X. 1999. Protein kinase C δ associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*; 274:34; 24392-24400.
- Ji, G., Lv, K., Chen, H., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Qu, L. 2019. Hydrogen peroxide modulates clock gene expression via PRX2-STAT3-REV-ERB α/β pathway. *Free Radical Biology and Medicine*; 145; 312-320.
- Jilg, A., Lesny, S., Peruzki, N., Schwegler, H., Selbach, O., Dehghani, F., Stehle, J. H. 2010. Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus*; 20:3; 377-388.
- Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., De Vries, G. J., Reppert, S. M. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*; 96:1; 57-68.

- Kagan, J. C., Medzhitov, R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*; 125:5; 943-955.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., Grusby, M. J. 1996a. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*; 382:6587; 174-177.
- Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., Grusby, M. J. 1996b. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity*; 4:3; 313-319.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*; 11:1; 115-122.
- Kawamura, M., McVicar, D. W., Johnston, J. A., Blake, T. B., Chen, Y. Q., Lal, B. K., Lloyd, A. R., Kelvin, D. J., Staples, J. E., Ortaldo, J. R., O'Shea, J. J. 1994. Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 91:14; 6374-6378.
- Keller, M., Mazuch, J., Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., Kramer, A., Maier, B. 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 106:50; 21407-21412.
- Kiessling, S., Dubeau-Laramée, G., Ohm, H., Labrecque, N., Olivier, M., Cermakian, N. 2017. The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Scientific Reports*; 7:1; 1-11.
- Kim, T. K., Maniatis, T. 1996. Regulation of interferon- γ -activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*; 273:5282; 1717-1719.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C. W. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*; 285:1-2; 1-24.
- Kiu, H., Nicholson, S. E. 2012. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*; 30:2; 88-106.
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., Lodish, H. F. 1995. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*; 80:5; 729-738.
- Klisch, C., Inyushkin, A., Mordel, J., Karnas, D., Pévet, P., Meissl, H. 2009. Orexin A modulates neuronal activity of the rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *European Journal of Neuroscience*; 30:1; 65-75.
- Komyod, W., Bauer, U. M., Heinrich, P. C., Haan, S., Behrmann, I. 2005. Are STATs arginine-methylated? *The Journal of Biological Chemistry*; 280:23; 21700-21705.
- Kornhauser, J. M., Nelson, D. E., Mayo, K. E., Takahashi, J. S. 1990. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*; 5:2; 127-134.

- Koyanagi, S., Ohdo, S. 2002. Alteration of intrinsic biological rhythms during interferon treatment and its possible mechanism. *Molecular Pharmacology*; 62:6; 1393-1399.
- Kubištová, A., Spišská, V., Petrželková, L., Hrubcová, L., Moravcová, S., Maierová, L., Bendová, Z. 2020. Constant light in critical postnatal days affects circadian rhythms in locomotion and gene expression in the suprachiasmatic nucleus, retina, and pineal gland later in life. *Biomedicines*; 8:12; 1-20.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*; 98:2; 193-205.
- Kurabayashi, N., Hirota, T., Harada, Y., Sakai, M., Fukada, Y. 2006. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiology International*; 23:1-2; 129-134.
- Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., Fukada, Y. 2010. DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Molecular and Cellular Biology*; 30:7; 1757-1768.
- Laurence, A., Tato, C. M., Davidson, T. S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R. B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E. M., O'Shea, J. J. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity*; 26:3; 371-381.
- Leak, R. K., Card, J. P., Moore, R. Y. 1999. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*; 819:1-2; 23-32.
- Lee, Ch., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., Reppert, S. M. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*; 107:7; 855-867.
- Lee, H. S., Nelms, J. L., Nguyen, M., Silver, R., Lehman, M. N. 2003. The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Neuroscience*; 6:2; 111-112.
- Lee, J. Y., Muenzberg, H., Gavrilova, O., Reed, J. A., Berryman, D., Villanueva, E. C., Louis, G. W., Leininger, G. M., Bertuzzi, S., Seeley, R. J., Robinson, G. W., Myers, Jr., M. G., Hennighausen, L. 2008. Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLOS One*; 3:2; 1-13.
- Lehman, M. N., Silver, R., Gladstone, W. R., Kahn, R. M., Gibson, M., Bittman, E. L. 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *The Journal of Neuroscience*; 7:6; 1626-1638.
- Lech, K., Ackermann, K., Revell, V. L., Lao, O., Skene, D. J., Kayser, M. 2016. Dissecting daily and circadian expression rhythms of clock-controlled genes in human blood. *Journal of Biological Rhythms*; 31:1; 68-81.
- Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J. J., Renauld, J. Ch. 2002. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP

- kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *The Journal of Biological Chemistry*; 277:37; 33676-33682.
- Leone, M. J., Marpegan, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A., Golombek, D. A. 2006. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *Journal of Neuroscience Research*; 84:7; 1521-1527.
- Leone, M. J., Marpegan, L., Duhart, J. M., Golombek, D. A. 2012. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiology International*; 29:6; 715-723.
- Lerant, A., Kanyicska, B., Freeman, M. E. 2001. Nuclear translocation of STAT5 and increased expression of Fos related antigens (FRAs) in hypothalamic dopaminergic neurons after prolactin administration. *Brain Research*; 904:2; 259-269.
- Lieberman, A. P., Pitha, P. M., Shin, H. S., Shin, M. L. 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 86:16; 6348-6352.
- Liongue, C., Ward, A. C. 2013. Evolution of the JAK-STAT pathway. *JAK-STAT*; 2:1; e22756-1-8.
- Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Hennighausen, L. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & Development*; 11:2; 179-186.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, Ch. D., Chang, D. D., Shuai, K. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95:18; 10626-10631.
- Liu, Ch., Reppert, S. M. 2000. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*; 25:1; 123-128.
- Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., Shuai, K. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 98:6; 3203-3207.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*; 25:4; 402-408.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., Schibler, U. 1997. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *The EMBO Journal*; 16:22; 6762-6771.
- Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M., Takahashi, J. S. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*; 288:5465; 483-492.
- Lu, Y. Ch., Yeh, W. Ch., Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*; 42:2; 145-151.

- Lutticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P. C., Horn, F. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*; 263:5143; 89-92.
- Ma, F. Y., Anderson, G. M., Gunn, T. D., Goffin, V., Grattan, D. R., Bunn, S. J. 2005. Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology*; 146:12; 5112-5119.
- Marpegán, L., Bekinschtein, T. A., Freudenthal, R., Rubio, M. F., Ferreyra, G. A., Romano, A., Golombek, D. A. 2004. Participation of transcription factors from the Rel/NF- κ B family in the circadian system in hamsters. *Neuroscience Letters*; 358:1; 9-12.
- Marpegán, L., Bekinschtein, T. A., Costas, M. A., Golombek, D. A. 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *Journal of Neuroimmunology*; 160:1-2; 102-109.
- Marpegán, L., Leone, M. J., Katz, M. E., Sobrero, P. M., Bekinstein, T. A., Golombek, D. A. 2009. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiology International*; 26:7; 1430-1442.
- Matějů, K., Bendová, Z., El-Hennamy, R., Sládek, M., Sosniyenko, S., Sumová, A. 2009. Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*; 29:3; 490-501.
- Maywood, E. S., Mrosovsky, N., Field, M. D., Hastings, M. H. 1999. Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96:26; 15211-15216.
- Maywood, E. S., Okamura, H., Hastings, M. H. 2002. Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *European Journal of Neuroscience*; 15:1; 216-220.
- McKimmie, C. S., Graham, G. J. 2010. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 394:4; 1006-1011.
- Mendoza, J. 2007. Circadian clocks: setting time by food. *Journal of Neuroendocrinology*; 19:2; 127-137.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C. F., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R. D. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK/STAT signaling pathway. *Cell*; 84:3; 431-442.

- Meyer-Bernstein, E. L., Morin, L. P. 1999. Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience*; 92:1; 267-279.
- Michel, S., Marek, R., Vanderleest, H. T., Vansteensel, M. J., Schwartz, W. J., Colwell, Ch. S., Meijer, J. H. 2013. Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*; 37:6; 964-971.
- Moga, M. M., Moore, R. Y. 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*; 389:3; 508-534.
- Moore, R. Y., Eichler, V. B. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*; 42:1; 201-206.
- Moore, R. Y., Lenn, N. J. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*; 146:1; 1-14.
- Moore, R. Y., Speh, J. C. 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*; 150:1; 112-116.
- Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z. 2016. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*; 94:1; 99-108.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H. 1995. Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Visual Neuroscience*; 12:1; 57-67.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H. 2001. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *The Journal of Comparative Neurology*; 437:1; 79-90.
- Morris, M. E., Viswanathan, N., Kuhlman, S., Davis, F. C., Weitz, Ch. J. 1998. A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science*; 279:5356; 1544-1547.
- Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., David, M. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α/β -induced transcription. *Cell*; 104:5; 731-741.
- Mrosovsky, N. 1996. Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biological Reviews*; 71:3; 343-372.
- Mühlbauer, E., Wolgast, S., Finckh, U., Peschke, D., Peschke, E. 2004. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Letters*; 564:1-2; 91-96.
- Mütze, J., Roth, J., Gerstberger, R., Hübschle, T. 2007. Nuclear translocation of the transcription factor STAT5 in the rat brain after systemic leptin administration. *Neuroscience Letters*; 417:3; 286-291.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., Kishimoto, T. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*; 387:6636; 924-929.

- Nakano, Y., Furube, E., Morita, S., Wanaka, A., Nakashima, T., Miyata, S. 2015. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*; 278; 144-158.
- Nakaya, M., Sanada, K., Fukada, Y. 2003. Spatial and temporal regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 305:3; 494-501.
- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Tanahashi, Y., Ikeda, M., Honma, K. 1999. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neuroscience Letters*; 267:1; 69-72.
- Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A. 1999. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *The EMBO Journal*; 18:2; 375-385.
- Novak, C. M., Nunez, A. A. 2000. A sparse projection from the suprachiasmatic nucleus to the sleep active ventrolateral preoptic area in the rat. *NeuroReport*; 11:1; 93-96.
- Núñez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J. F., Brooks, H. J., O'Neill, L. A., Gay, N. J., Bryant, C. E., Monie, T. P. 2007. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLOS One*; 2:8; 1-12.
- Obrietan, K., Impey, S., Storm, D. R. 1998. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nature Neuroscience*; 1:8; 693-700.
- Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., Storm, D. R. 1999. Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *The Journal of Biological Chemistry*; 274:25; 17748-17756.
- O'Callaghan, E. K., Anderson, S. T., Moynagh, P. N., Coogan, A. N. 2012. Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse. *PLOS One*; 7:10; 1-14.
- O'Callaghan, J. P., Kelly, K. A., VanGilder, R. L., Sofroniew, M. V., Miller, D. B. 2014. Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLOS One*; 9:7; 1-17.
- O'Keefe, S. M., Beynon, A. L., Davies, J. S., Moynagh, P. N., Coogan, A. N. 2017. NF- κ B signaling is involved in immune-modulation, but not basal functioning, of the mouse suprachiasmatic circadian clock. *European Journal of Neuroscience*; 45:8; 1111-1123.
- O'Neill, J. S., Reddy, A. B. 2011. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*; 469:7331; 498-503.
- Ohbayashi, N., Ikeda, O., Taira, N., Yamamoto, Y., Muromoto, R., Sekine, Y., Sugiyama, K., Honjoh, T., Matsuda, T. 2007. LIF- and IL-6-induced acetylation of STAT3 at Lys-685 through PI3K/Akt activation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*; 30:10; 1860-1864.

- Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, M., Hirano, T. 2000. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity*; 12:1; 95-105.
- Oishi, K., Ohkura, N., Kadota, K., Kasamatsu, M., Shibusawa, K., Matsuda, J., Machida, K., Horie, S., Ishida, N. 2006. *Clock* mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. *Journal of Circadian Rhythms*; 4:13; 1-7.
- Okada, K., Yano, M., Doki, Y., Azama, T., Iwanaga, H., Miki, H., Nakayama, M., Miyata, H., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Ishida, N., Monden, M. 2008. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *Journal of Surgical Research*; 145:1; 5-12.
- Okugawa, S., Ota, Y., Kitazawa, T., Nakayama, K., Yanagimoto, S., Tsukada, K., Kawada, M., Kimura, S. 2003. Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*; 285:2; 399-408.
- Opal, S. M. 2010. Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology*; 167; 14-24.
- Osland, T. M., Fernø, J., Håvik, B., Heuch, I., Ruoff, P., Lærum, O. D., Steen, V. M. 2011. Lithium differentially affects clock gene expression in serum-shocked NIH-3T3 cells. *Journal of Psychopharmacology*; 25:7; 924-933.
- Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Hejnová, L., Novotný, J., Bendová, Z. 2015. Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *British Journal of Pharmacology*; 172:14; 3638-3649.
- Paladino, N., Leone, M. J., Plano, S. A., Golombek, D. A. 2010. Paying the circadian toll: The circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *Journal of Neuroimmunology*; 225:1-2; 62-67.
- Paladino, N., Mul Fedele, M. L., Duhart, J. M., Marpegan, L., Golombek, D. A. 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- α . *Chronobiology International*; 31:5; 668-679.
- Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Jegla, T. 2005. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*; 307:5709; 600-604.
- Park, Ch., Li, S., Cha, E., Schindler, Ch. 2000. Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*; 13:6; 795-804.
- Paul, J. R., DeWoskin, D., McMeekin, L. J., Cowell, R. M., Forger, D. B., Gamble, K. L. 2016. Regulation of persistent sodium currents by glycogen synthase kinase 3 encodes daily rhythms of neuronal excitability. *Nature Communications*; 7; 1-11.
- Paul, J. R., McKeown, A. S., Davis, J. A., Totsch, S. K., Mintz, E. M., Kraft, T. W., Cowell, R. M., Gamble, K. L. 2017. Glycogen synthase kinase 3 regulates photic

- signaling in the suprachiasmatic nucleus. *The European Journal of Neuroscience*; 45:8; 1102-1110.
- Pelegri, C., Vilaplana, J., Castellote, C., Rabanal, M., Franch, A., Castell, M. 2003. Circadian rhythms in surface molecules of rat blood lymphocytes. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*; 284:1; 67-76.
- Peng, S. Ch., Lai, Y. T., Huang, H. Y., Huang, H. D., Huang, Y. S. 2010. A novel role of CPEB3 in regulating EGFR gene transcription via association with Stat5b in neurons. *Nucleic Acids Research*; 38:21; 7446-7457.
- Petrzilka, S., Taraborrelli, C., Cavadini, G., Fontana, A., Birchler, T. 2009. Clock gene modulation by TNF- α depends on calcium and p38 MAP kinase signaling. *Journal of Biological Rhythms*; 24:4; 283-294.
- Pfützner, E., Jähne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., Groner, B. 1998. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Molecular Endocrinology*; 12:10; 1582-1593.
- Pickard, G. E. 1982. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *The Journal of Comparative Neurology*; 211:1; 65-83.
- Pincheira, R., Castro, A. F., Ozes, O. N., Idumalla, P. S., Donner, D. B. 2008. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *The Journal of Immunology*; 181:2; 1288-1298.
- Pircher, T. J., Petersen, H., Gustafsson, J. Å., Haldosén, L. A. 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Molecular Endocrinology*; 13:4; 555-565.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*; 282:5396; 2085-2088.
- Pramong, R., Wongchitrat, P., Govitrapong, P., Phansuwan-Pujito, P. 2015. Development of clock genes expression in rat hippocampus. *Journal of the Medical Association of Thailand*; 98:9; 123-129.
- Preitner, N., Damiola, F., Molina, L. L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. 2002. The orphan nuclear receptor Rev-erb α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*; 110:2; 251-260.
- Prendergast, B. J., Cable, E. J., Stevenson, T. J., Onishi, K. G., Zucker, I., Kay, L. M. 2015. Circadian disruption alters the effects of lipopolysaccharide treatment on circadian and ultradian locomotor activity and body temperature rhythms of female Siberian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*; 30:6; 543-556.

- Prolo, L. M., Takahashi, J. S., Herzog, E. D. 2005. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *The Journal of Neuroscience*; 25:2; 404-408.
- Prosser, R. A. 2003. Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Research*; 966:1; 110-115.
- Ralph, M.R., Menaker, M. 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*; 241:4870; 1225-1227.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., Menaker, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*; 247:4945; 975-978.
- Rawadi, G., Ramez, V., Lemerrier, B., Roman-Roman, S. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins in murine macrophages: involvement in cytokine synthesis. *The Journal of Immunology*; 160:3; 1330-1339.
- Ray, S., Boldogh, I., Brasier, A. R. 2005. STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen. *Gastroenterology*; 129:5; 1616-1632.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., McKnight, S. L. 2001. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*; 293:5529; 506-509.
- Ripperger, J. A., Shearman, L. P., Reppert, S. M., Schibler, U. 2000. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes & Development*; 14:6; 679-689.
- Ruff-Jamison, S., Zhong, Z., Wen, Z., Chen, K., Darnell, J. E. Jr., Cohen, S. 1994. Epidermal growth factor and lipopolysaccharide activate Stat3 transcription factor in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*; 269:35; 21933-21935.
- Rummel, Ch. 2016. Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*; 54; 1-14.
- Rusak, B., Meijer, J. H., Harrington, M. E. 1989. Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Research*; 493:2; 283-291.
- Sadki, A., Bentivoglio, M., Kristensson, K., Nygård, M. 2007. Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiology of Aging*; 28:2; 296-305.
- Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, Ch., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. 2010. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3 β -mediated phosphorylation. *PLOS One*; 5:1; 1-9.
- Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., Miyake, K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*; 16:7; 961-969.

- Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K., Ishida, N. 1998. Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *Journal of Biological Chemistry*; 273:42; 27039-27042.
- Sakurai, T., Nagata, R., Yamanaka, A., Kawamura, H., Tsujino, N., Muraki, Y., Kageyama, H., Kunita, S., Takahashi, S., Goto, K., Koyama, Y., Shioda, S., Yanagisawa, M. 2005. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. *Neuron*; 46:2; 297-308.
- Sanada, K., Okano, T., Fukada, Y. 2002. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *The Journal of Biological Chemistry*; 277:1; 267-271.
- Sanada, K., Harada, Y., Sakai, M., Todo, T., Fukada, Y. 2004. Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes to Cells*; 9:8; 697-708.
- Sarafian, T. A., Montes, C., Imura, T., Qi, J., Coppola, G., Geschwind, D. H., Sofroniew, M. V. 2010. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLOS One*; 5:3; 1-11.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A., Yoshimura, A. 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes to Cells*; 4:6; 339-351.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., Yoshimura, A. 2000. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *The Journal of Biological Chemistry*; 275:38; 29338-29347.
- Sasaki, M., Yoshitane, H., Du, N. H., Okano, T., Fukada, Y. 2009. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription. *Journal of Biological Chemistry*; 284:37; 25149-25159.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A., Hogenesch, J. B. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*; 43:4; 527-537.
- Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Shirato, K., Ishibashi, Y., Oh-ishi, S., Imaizumi, K., Haga, S., Hitomi, Y., Izawa, T., Ohira, Y., Ohno, H., Kizaki, T. 2014a. Direct and indirect suppression of interleukin-6 gene expression in murine macrophages by nuclear orphan receptor REV-ERB α . *The Scientific World Journal*; 2014; 1-10.
- Sato, S., Sakurai, T., Ogasawara, J., Takahashi, M., Izawa, T., Imaizumi, K., Taniguchi, N., Ohno, H., Kizaki, T. 2014b. A circadian clock gene, Rev-erba, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *The Journal of Immunology*; 192:1; 407-417.

- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, Jr., L. F., Reppert, S. M. 1997. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*; 19:6; 1261-1269.
- Shi, S., Hida, A., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., Yamazaki, S., Johnson, C. H. 2010. Circadian clock gene *Bmal1* is not essential after all; functional replacement with its paralog, *Bmal2*. *Current Biology*; 20:4; 316-321.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*; 189:11; 1777-1782.
- Shuai, K., Schindler, Ch., Prezioso, V. R., Darnell, Jr. J. E. 1992. Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science*; 258:5089; 1808-1812.
- Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M., Darnell, Jr. J. E. 1993. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science*; 261:5129; 1744-1746.
- Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., Darnell, Jr. J. E. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*; 76:5; 821-828.
- Schibler, U., Ripperger, J., Brown, S. A. 2003. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *Journal of Biological Rhythms*; 18:3; 250-260.
- Schindler, Ch., Shuai, K., Prezioso, V. R., Darnell, Jr. J. E. 1992. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*; 257:5071; 809-813.
- Schuringa, J. J., Schepers, H., Vellenga, E., Kruijer, W. 2001a. Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation. *FEBS Letters*; 495:1-2; 71-76.
- Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., Kruijer, W. 2001b. Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase C δ is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *The Journal of Biological Chemistry*; 276:29; 27709-27715.
- Silver, A. C., Arjona, A., Hughes, M. E., Nitabach, M. N., Fikrig, E. 2012. Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain, Behavior, and Immunity*; 26:3; 407-413.
- Singru, P. S., Sánchez, E., Acharya, R., Fekete, C., Lechan, R. M. 2008. Mitogen-activated protein kinase contributes to lipopolysaccharide-induced activation of corticotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*; 149:5; 2283-2292.
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W. J., Jove, R. 2000. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene*; 19:48; 5419-5427.

- Soták, M., Polidarová, L., Musílková, J., Hock, M., Sumová, A., Pácha, J. 2011. Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*; 301:6; G1066–G1074.
- Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Schumer, M., Antoch, M. P. 2009. A serine cluster mediates BMAL-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle*; 8:24; 4138-4146.
- Spišská, V., Pačesová, D., Míková, H., Pohanová, P., Telenský, P., Novotný, J., Bendová, Z. 2020. Prenatal exposure to lipopolysaccharide induces changes in the circadian clock in the SCN and AA-NAT activity in the pineal gland. *Brain Research*; 1743; 1-8.
- Sriram, K., Benkovic, S. A., Hebert, M. A., Miller, D. B., O'Callaghan, J. P. 2004. Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *The Journal of Biological Chemistry*; 279:19; 19936-19947.
- Stambolic, V., Woodgett, J. R. 1994. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 β in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical Journal*; 303:3; 701-704.
- Standke, G. J., Meier, V. S., Groner, B. 1994. Mammary gland factor activated by prolactin on mammary epithelial cells and acute-phase response factor activated by interleukin-6 in liver cells share DNA binding and transactivation potential. *Molecular Endocrinology*; 8:4; 469-477.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J. L., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., Hilton, D. J. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*; 387:6636; 917-921.
- Stephan, F. K., Zucker, I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 69:6; 1583-1586.
- Stephanou, A., Isenberg, D. A., Nakajima, K., Latchman, D. S. 1999. Signal transducer and activator of transcription-1 and heat shock factor-1 interact and activate the transcription of the Hsp-70 and Hsp-90 β gene promoters. *The Journal of Biological Chemistry*; 274:3; 1723-1728.
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*; 291:5503; 490-493.
- Strehlow, I., Schindler, Ch. 1998. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *The Journal of Biological Chemistry*; 273:43; 28049-28056.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., Cohen, P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochemical Journal*; 296:1; 15-19.

- Svobodová, I., Bhattacharya, A., Ivetic, M., Bendova, Z., Zemkova, H. 2018. Circadian ATP release in organotypic cultures of the rat suprachiasmatic nucleus is dependent on P2X7 and P2Y receptors. *Frontiers in Pharmacology*; 9:192; 1-13.
- Takahashi, S., Yokota, S., Hara, R., Kobayashi, T., Akiyama, M., Moriya, T., Shibata, S. 2001. Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse. *Endocrinology*; 142:11; 4910-4917.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*; 380:6575; 627-630.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 94:8; 3801-3804.
- Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., Akira, S. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *The Journal of Immunology*; 161:9; 4652-4660.
- Tang, Z., Xu, T., Li, Y., Fei, W., Yang, G., Hong, Y. 2020. Inhibition of CRY2 by STAT3/miRNA-7-5p promotes osteoblast differentiation through upregulation of CLOCK/BMAL1/P300 expression. *Molecular Therapy – Nucleic Acids*; 19; 865-876.
- Tanner, J. W., Chen, W., Young, R. L., Longmore, G. D., Shaw, A. S. 1995. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry*; 270:12; 6523-6530.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, Ch., Ozawa, R., Hirose, M., Sakaki, Y. 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature*; 389:6650; 512-516.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Ulevitch, R. J. 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *Journal of Experimental Medicine*; 164:3; 777-793.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Ulevitch, R. J. 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*; 264:18; 10867-10871.
- Trávníčková-Bendová, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., Sassone-Corsi, P. 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 99:11; 7728-7733.
- Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Iino, M., Hashimoto, S. 2005. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature Genetics*; 37:2; 187-192.

- Udy, G. B., Towers, R. P., Snell, R. G., Wilkins, R. J., Park, S. H., Ram, P. A., Waxman, D. J., Davey, H. W. 1997. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 94:14; 7239-7244.
- Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D. J., Silvennoinen, O. 2002. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Molecular and Cellular Biology*; 22:10; 3316-3326.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Grönholm, J., Palvimo, J. J., Silvennoinen, O. 2005. SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood*; 106:1; 224-226.
- Vainchenker, W., Leroy, E., Gilles, L., Marty, C., Plo, I., Constantinescu, S. N. 2018. JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000 Research*; 7:82; 1-19.
- van den Pol, A. N. 1980. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *The Journal of Comparative Neurology*, 191:4; 661-702.
- Vogt, M., Domoszlai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., Schmitt, A., Poli, V., Richtering, W., Müller-Newen, G. 2010. The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *Journal of Cell Science*; 124:6; 900-909.
- Wang, X., Reece, S. P., Van Scott, M. R., Brown, J. M. 2011. A circadian clock in murine bone marrow-derived mast cells modulates IgE-dependent activation in vitro. *Brain, Behavior, and Immunity*; 25:1; 127-134.
- Wang, Y., Kuang, Z., Yu, X., Ruhn, K. A., Kubo, M., Hooper, L. V. 2017. The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science*; 357:6354; 912-916.
- Washburn, K. B., Neary, J. T. 2006. P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience*; 142:2; 411-423.
- Wegenka, U. M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P. C., Horn, F. 1993. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Molecular and Cellular Biology*; 13:1; 276-288.
- Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y. J., Sepuri, N. B. V., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D. P., Wolfman, A., Stuehr, D., Hassan, M. O., Fu, X. Y., Avadhani, N., Drake, J. I., Fawcett, P., Lesniewsky, E. J., Larner, A. C. 2009. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science*; 323:5915; 793-797.
- Wei, L., Laurence, A., O'Shea, J. J. 2008. New insight into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 19:4; 394-400.

- Wei, J., Yuan, Y., Jin, Ch., Chen, H., Leng, L., He, F., Wang, J. 2012. The ubiquitin ligase TRAF6 negatively regulates the JAK-STAT signaling pathway by binding to STAT3 and mediating its ubiquitination. *PLOS One*; 7:11; 1-7.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., Reppert, S. M. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*; 14:4; 697-706.
- Wen, Z., Zhong, Z., Darnell, Jr., J. E. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*; 82:2; 241-250.
- Wierenga, A. T. J., Vogelzang, I., Eggen, B. J. L., Vellenga, E. 2003. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Experimental Hematology*; 31:5; 398-405.
- Wilks, A. F. 1989. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 86:5; 1603-1607.
- Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zürcher, G., Ziemiecki, A. 1991. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*; 11:4; 2057-2065.
- Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Miura, O., Lai, K. S., Cwik, C., Liu, E. T., Ihle, J. N. 1994. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature*; 370:6485; 153-157.
- Wojciak, J. M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., Wright, P. E. 2009. Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains. *The EMBO Journal*; 28:7; 948-958.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*; 249:4975; 1431-1433.
- Xu, X., Sun, Y. L., Hoey, T. 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*; 273:5276; 794-797.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *The Journal of Immunology*; 169:12; 6668-6672.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*; 301:5633; 640-643.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., Takumi, T. 2004. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*; 5:18; 1-9.

- Yamamura, Y., Yano, I., Kudo, T., Shibata, S. 2010. Time-dependent inhibitory effect of lipopolysaccharide injection on *Per1* and *Per2* gene expression in the mouse heart and liver. *Chronobiology International*; 27:2; 213-232.
- Yamawaki, Y., Kimura, H., Hosoi, T., Ozawa, K. 2010. MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 298:2; 403-410.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*; 288:5466; 682-685.
- Yan, H., Krishnan, K., Greenlund, A. C., Gupta, S., Lim, J. T. E., Schreiber, R. D., Schindler, Ch. W., Krolewski, J. J. 1996. Phosphorylated interferon- α receptor 1 subunit (IFN α R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *The EMBO Journal*; 15:5; 1064-1074.
- Yan, Z., Gibson, S. A., Buckley, J. A., Qin, H., Benveniste, E. N. 2018. Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical Immunology*; 189; 4-13.
- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., Stark, G. R. 2005. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Research*; 65:3; 939-947.
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., Dong, Ch. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*; 282:13; 9358-9363.
- Yi, T., Mui, A. L. F., Krystal, G., Ihle, J. N. 1993. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor β chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Molecular and Cellular Biology*; 13:12; 7577-7586.
- Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., Lazar, M. A. 2006. Nuclear receptor Rev-erb α is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science*; 311:5763; 1002-1005.
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., Reeves, S. A. 2000. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology*; 10:1; 47-50.
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., Takahashi, J. S. 2004. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 101:15; 5339-5346.
- Yoshida, K., Hashiramoto, A., Okano, T., Yamane, T., Shibamura, N., Shiozawa, S. 2013. TNF- α modulates expression of the circadian clock gene *Per2* in rheumatoid synovial cells. *Scandinavian Journal of Rheumatology*; 42:4; 276-280.

- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., Miyajima, A. 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO Journal*; 14:12; 2816-2826.
- Young, M. E., Razeghi, P., Taegtmeyer, H. 2001. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy. *Circulation Research*; 88:11; 1142-1150.
- Yu, Ch. L., Jin, Y. J., Burakoff, S. J. 2000. Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *The Journal of Biological Chemistry*; 275:1; 599-604.
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., Jove, R. 2014. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*; 14:11; 739-746.
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D., Chin, Y. E. 2005. STAT3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*; 307:5707; 269-273.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H. Ch., Schindler, Ch., Chen-Kiang, S. 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*; 267:5206; 1990-1994.
- Zhang, J. J., Vinkemeier, U., Gu, W., Chakravarti, D., Horvath, C. M., Darnell, Jr., J. E. 1996. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon γ signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 93:26; 15092-15096.
- Zhang, X., Wrzeszczynska, M. H., Horvath, C. M., Darnell, Jr. J. E. 1999. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*; 19:10; 7138-7146.
- Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W., Cao, X. 2000. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Molecular and Cellular Biology*; 20:19; 7132-7139.
- Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E. Jr. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*; 264:5155; 95-98.
- Zhu, M., John, S., Berg, M., Leonard, W. J. 1999. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell*; 96:1; 121-130.
- Zhu, W., Mustelin, T., David, M. 2002. Arginine methylation of STAT1 regulates its dephosphorylation by T cell protein tyrosine phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*; 277:39; 35787-35790.

10. Přílohy - Seznam publikací *in extenso*

10.1. Příloha A

Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z. 2016. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*; 94:1; 99-108. (IF=4,139)

10.2. Příloha B

Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyčerová, H., Spišská, V., Novotný, J., Bendová, Z. 2018. The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PLOS One*; 13:9; 1-16. (IF=2,776)

10.1. Příloha A

Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide

2016

Journal of Neuroscience Research; 94:1; 99-108

Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., Bendová, Z.

Identification of STAT3 and STAT5 Proteins in the Rat Suprachiasmatic Nucleus and the Day/Night Difference in Astrocytic STAT3 Phosphorylation in Response to Lipopolysaccharide

Simona Moravcová, Kateřina Červená, Dominika Pačesová, and Zdeňka Bendová*

Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins regulate many aspects of cellular physiology from growth and differentiations to immune responses. Using immunohistochemistry, we show the daily rhythm of STAT3 protein in the rat suprachiasmatic nucleus (SCN), with low but significant amplitude peaking in the morning. We also reveal the strong expression of STAT5A in astrocytes of the SCN and the STAT5B signal in nonastrocytic cells. Administration of lipopolysaccharide (LPS) acutely induced phosphorylation of STAT3 on Tyr705 during both the day and the night and induced phosphorylation on Ser727 but only after the daytime application. The LPS-induced phospho-STAT3 (Tyr705) remained elevated for 24 hr after the daytime application but declined within 8 hr when LPS was applied at night. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: suprachiasmatic nucleus; STAT proteins; rat; lipopolysaccharide; circadian clock

The signal transducers and activators of transcription (STAT) gene family consists of seven proteins (STAT1, -2, -3, -4, -5A, -5B, and -6) that function as transcription factors mediating the effect of cytokines, growth factors, opioids, and a number of hormones on the expression of a variety of target genes (Kiu and Nicholson, 2012). Ligand binding to specific cell-surface receptors activates tyrosine kinases of the Jak family that phosphorylate STAT proteins. Activated STATs make homo- and heterodimers, translocate to the nucleus, and affect gene transcription (Rajan, 2011). In addition to this classical signaling model, STATs can mediate gene expression even in their unphosphorylated state (Yang and Stark, 2008; Timofeeva and Tarasova, 2012), or they can interact with other transcription factors such as SP1 or HSF-1, with coactivators such as CBP/p300 or with extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2) kinases (Pircher et al., 1999; Chatterjee-Kishore et al., 2000; Wyszomierski and Rosen, 2001).

Individual STATs can be activated in response to several different stimuli, depending on tissue and function. Activation of STAT3 is associated predominantly

with neurotrophic factors, leptin, and immune responses (Pellegrino and Habecker, 2013; Wunderlich et al., 2013; Nakano et al., 2015). Jak2/STAT3 signaling has also been implicated in NMDA-induced long-term depression in the hippocampus (Nicolas et al., 2012). STAT5 was originally discovered as a transcription factor mediating the prolactin response in mammary epithelial cells and has been studied extensively to determine its role in growth hormone signaling, leukemogenesis, and proliferation of various cancer cells (Watson and Burdon, 1996; Bennett et al., 2005; Wang and Bunting, 2013). Data also indicate the involvement of STATs in neuronal and glial differentiation. STAT3 signaling has been shown to be a critical part of astroglialogenesis (He et al., 2005), and STAT5 is

SIGNIFICANCE:

The suprachiasmatic nucleus (SCN) functions as the major circadian oscillator in the body. It is sensitive to various external cues that affect its setting and, thus, the timing of many physiological processes. Using immunohistochemistry, we demonstrate the presence of signal transducers and activators of transcription (STAT) 3, STAT5A, and STAT5B in the rat SCN. Although the role of both STAT5 forms in the SCN remains elusive, STAT3 is activated by bacterial endotoxin in a time-dependent manner and may be involved in the immune responses of the SCN astrocytes.

Contract grant sponsor: Czech Science Foundation; Contract grant number: P303/12/1137; Contract grant sponsor: Ministry of Education, Youth, and Sport of the Czech Republic; Contract grant number: SVV-260208/2015.

*Correspondence to: Zdeňka Bendová, Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, Prague 2 128 43, Czech Republic. E-mail: zdenka.bendova@natur.cuni.cz

Received 2 July 2015; Revised 1 September 2015; Accepted 8 September 2015

Published online 30 September 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23673

involved in axon guidance in forebrain structures (Markham et al., 2007; Gupta et al., 2011).

The suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus serve as a circadian clock that drives daily rhythms in physiology and behavior in mammals (Moore, 2013). Its endogenous oscillations are entrained by photic and non-photic stimuli that affect the SCN signaling pathways, leading to phase shifting of endogenous circadian rhythmicity (Golombek and Rosenstein, 2010). Most of the principal signaling pathways, such as mitogen-activated protein (MAPK) kinase, cAMP, mammalian target of rapamycin (mTOR), or a G-protein coupled pathway, have been described as playing significant roles for time-keeping processes in the SCN or for the photic and non-photic entrainment of the circadian clock (Butcher et al., 2005; Jakubcakova et al., 2007; Cao et al., 2008; Brancaccio et al., 2013). The SCN is sensitive to a variety of signals such as brain-derived neurotrophic factor (Kim et al., 2006; Girardet et al., 2013), opioids (Pačesová et al., 2015), and a variety of cytokines (Cermakian et al., 2013), all of which have been shown to exert their function via the Jak/STAT pathway. However, direct reports with respect to STAT signaling in the SCN are lacking. Promoter meta-analysis of DNA arrays of the clock-controlled genes have revealed STAT3 as a possible factor that might be integrated into the regulatory network of the circadian clock in mammals (Bozek et al., 2009). STAT3 gene circadian oscillations have been reported in murine brown adipose tissue, and some signals of phospho- (p) STAT3 in the SCN have been mentioned in connection with leptin signaling in the hypothalamus (Ptitsyn and Gimble, 2007; Grosbellet et al., 2015). The only report of STAT5 in the SCN arose from studies of prolactin signaling in doves (Buntin and Buntin, 2014). Here we describe the presence of members of the Jak/STAT signaling pathway in the rat SCN and the proteins STAT3, -5A, and -5B. To elucidate the presumed role of STAT proteins in the circadian clock, we tested their responsiveness to the endotoxin lipopolysaccharide (LPS), one of the most potent activators of the immune system, and STAT signaling in other parts of the brain. For the SCN, the effect of septic or low-dose LPS is the subject of extensive studies (for review see Curtis et al., 2014). The low dose of LPS has been shown to suppress locomotor activity in rats, downregulate clock gene expression in the SCN, and induce immediate early gene *c-Fos* when applied in the active phase of the circadian cycle (Okada et al., 2008; Guerrero-Vargas et al., 2014). A time-of-day effect of LPS administration on the proinflammatory cytokine production along with temperature and behavioral responses has been documented in several studies (Marpegán et al., 2005; Sadki et al., 2007; Guerrero-Vargas et al., 2014). Our data suggest the possible involvement of STAT3 expressed in astrocytes in the responses of the SCN to LPS. The dynamics of STAT3 phosphorylation indicate that the effect of time on changes induced by LPS may also apply for the STAT3 signaling pathway.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (Velaz Ltd., Koleč, Czech Republic) were maintained under a 12-hr light–dark regimen at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with free access to food and water for at least 2 weeks before the experiment. All experiments were conducted under license No. A5228-01 of the U.S. National Institutes of Health and in accordance with the Animal Protection Law of the Czech Republic (license No. MSMT-23852/2014–14).

Experimental Design

Daily profiles of STAT3 and STAT5 in the SCN. Three adult rats were deeply anesthetized with thiopental (50 mg/kg) in 4-hr intervals and perfused through the aorta with heparinized saline followed by phosphate-buffered saline (PBS; 0.01 M sodium phosphate/0.15 M NaCl, pH 7.2) and then with 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were removed, postfixed for 12 hr at 4°C , cryoprotected in 20% sucrose in PBS overnight at 4°C , and stored at -80°C . Time was expressed as Zeitgeber time (ZT), where ZT0 corresponds to the time of lights on and ZT12 corresponds to the time of lights off. The experiment was performed twice with three animals per experiment for a total of six animals.

Effect of LPS on pSTAT3 levels in the SCN. Twelve adult rats received intraperitoneal injection of LPS (1 mg/kg) at ZT6 or ZT15. Twelve control animals in each time group received saline. Three experimental and control animals were anesthetized by thiopental 2, 5, 8, and 24 hr later and perfused as described above. The experiment was repeated twice.

Immunohistochemistry

Brains were sectioned into series of 30- μm -thick free-floating coronal slices throughout the rostral-caudal extent of the SCN. Levels of STAT5A, STAT5B, pSTAT5 (antibody purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA), STAT3, pSTAT3 (Tyr705), and pSTAT3 (Ser727; antibody purchased from Cell Signaling Technology, Danvers, MA; see Table I) were assessed by immunohistochemistry with the avidin/biotin method with diaminobenzidine as the chromogen (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA), as described by Bendová et al. (2012). For pSTAT3 detection, sections were treated with 1% NaOH and 1% H_2O_2 for 20 min, 0.3% glycine for 10 min, and 0.03% sodium dodecyl sulfate for 10 min, as described by Frontini et al. (2008). After having been rinsed in PBS, sections were blocked with 2% normal goat serum and incubated overnight in primary antibody. Immunopositive cells were manually tagged and counted in Image J (NIH) by three researchers who were blind to the experimental groups, with similar results. The values for each animal were calculated as the mean number of the left and the right SCN in one or two sections from the midcaudal region. To delineate the position of the SCN, the boundary of the STAT3 signal at ZT4, the peak time of STAT3 expression, was saved as a region of interest and applied to all immunohistochemical images. For binary black-and-white images, photomicrographs were converted to 16-bit

TABLE I. Antibodies Used

Antigen	Description of immunogen	Source, host species, catalog No., RRID	Concentration used
STAT3 (79D7)	STAT3 fusion protein corresponding to the carboxy-terminal sequence of mouse STAT3 protein	Cell Signaling Technology, rabbit monoclonal, 4904, AB_10693927	1:300
pSTAT3 (Tyr705)	Synthetic phosphopeptide corresponding to residues surrounding Tyr705 of mouse STAT3	Cell Signaling Technology, rabbit monoclonal, 9145, AB_561305	1:300
pSTAT3 (Ser727)	Synthetic phosphopeptide corresponding to residues surrounding Ser727 of mouse STAT3	Cell Signaling Technology, rabbit polyclonal, 9134, AB_331589	1:300
STAT5A	Peptide corresponding to the C-terminus of murine STAT5A coupled to protein carrier	Invitrogen, mouse monoclonal (clone ST5a-2H2), 13-3600, AB_86591	1:100
STAT5B	Peptide corresponding to the C-terminus of murine STAT5B coupled to protein carrier	Invitrogen, rabbit polyclonal, 71-2500, AB_88026	1:100
pSTAT5	Synthetic tyrosine-phosphorylated peptide encompassing the conserved C-terminal tyrosine phosphorylation site (Y694) of murine STAT5	Invitrogen, rabbit polyclonal, 71-6900, AB_10836771	1:100
GFAP (GA5)	Purified GFAP from pig spinal cord	Abcam, Cy3-conjugated mouse monoclonal, ab49874, AB_880203	1:400

images and adjusted by autothreshold with the triangle method. For colocalization, the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) conjugated with Cy3 was used (antibody purchased from Abcam, Cambridge, United Kingdom).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean of values from the left and the right SCN and as mean \pm SEM of the percentage of maximal value in each assay. In the case of pSTAT3 profiles, the numbers of positive cells in each of the two assays were calculated as a ratio of maximum STAT3 values. Data were analyzed by one-way ANOVA. Two-way ANOVA and post hoc pairwise comparisons by the Sidak-Bonferroni method were performed for LPS treatment. $P < 0.05$ was required for significance.

RESULTS

Daily Rhythm of STAT3 but Not STAT5A or STAT5B Within the Rat SCN

Daily profiles of STAT3, -5A, and -5B proteins were investigated within the entire SCN. As shown in Figure 1, the protein level of STAT3 changed over the 24-hr cycle ($F[11,34] = 3.707$, $P = 0.0016$). The number of STAT3-immunoreactive cells increased significantly between ZT20 and ZT4 ($F[6] = 8.626$, $P < 0.05$) and decreased between ZT4 and ZT8 ($F[6] = 11.285$, $P < 0.05$). No significant rhythms were detected for the expression of phosphorylated forms of STAT3 (pSTAT3 [Y705], $F[11,36] = 1.970$, $P = 0.0621$, and pSTAT3 [S727], $F[11,36] = 1.058$, $P = 0.4203$; Fig. 1A). No significant rhythms were detected for STAT5A ($F[11,34] = 1.786$, $P = 0.0935$) or STAT5B ($F[11,34] = 1.814$, $P = 0.0915$) expression in the SCN, and both proteins displayed constant levels predominantly in the ventrolateral SCN (Fig. 2).

In the Rat SCN, STAT3 and STAT5A but not STAT5B Are Localized Mostly in Astrocytes

Because STAT proteins are often expressed in astrocytes, we performed double immunofluorescence of STAT3, -5A, and -5B with the astrocytic marker GFAP within the SCN. As demonstrated in Figures 1B and 3, the STAT3 and STAT5A signals overlap with GFAP, which suggests their astrocytic origin. In contrast, the STAT5B-immunopositive cells express no positivity for GFAP (Fig. 3C,D). The quantification of GFAP/STAT double-positive cells within the entire SCN supports the astrocytic origin of the STAT-expressing cells; sections of the rat SCN collected at ZT24 and ZT4 were stained with anti-STAT3, and the number of double-positive cells was 106 ± 26 ($n = 3$), which made up 83% of total immunopositive cells. The number of STAT5A/GFAP double-positive cells was 93 ± 5 ($n = 3$), which made up 87% of total immunopositive cells.

Phosphorylation of STAT3 on Ser727 and Prolonged Phosphorylation of STAT3 on Tyr705 in Astrocytes of the SCN Induced by LPS Applied During the Daytime

Acute administration of LPS at a dose of 1 mg/kg induced the phosphorylated form of STAT3 mostly in astrocytes and with a day/night difference (Fig. 4). No effect on the STAT5 phosphorylation level was observed (data not shown). LPS applied at ZT6 significantly induced pSTAT3 (Y705) within 5 hr ($F[7] = 58.887$, $P < 0.01$, one-way ANOVA), and the level was still elevated in the SCN 24 hr after the LPS application ($F[7] = 22.555$, $P < 0.01$, one-way ANOVA). A two-way ANOVA showed the significant effect of time ($F[1,36] = 42.830$, $P < 0.0001$) and treatment ($F[3,36] = 3.024$,

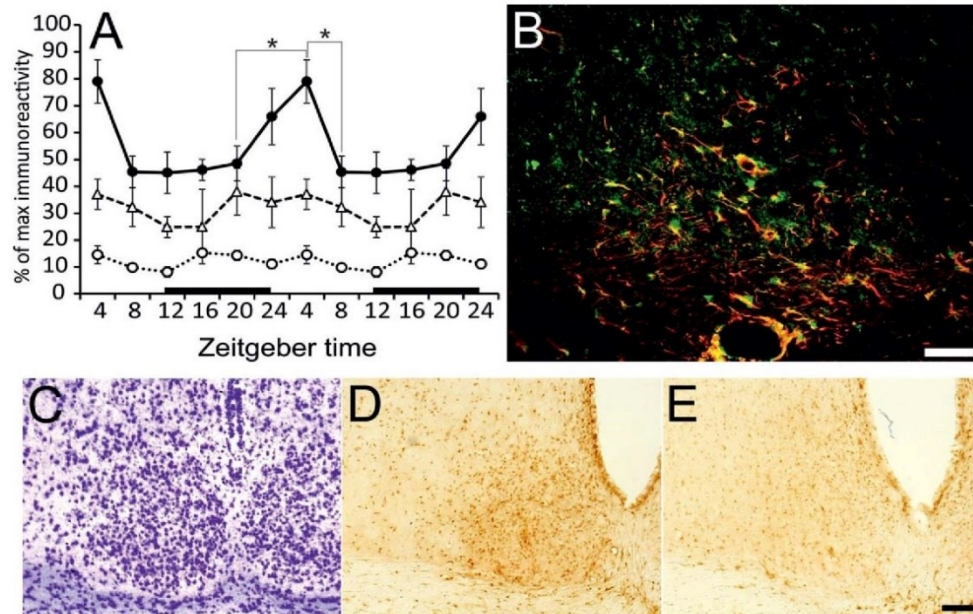


Fig. 1. Rhythmic expression of STAT3 in the rat SCN. **A:** Sections of the rat SCN collected in 4-hr intervals over the daily cycle were stained with anti-STAT3 (solid circles), anti-pSTAT3 (Tyr705; open circles), and pSTAT3 (Ser727; triangles) antibodies. Data are percentages of maximal values in each assay for STAT3 and as a ratio of maximum STAT3 values in each assay. Each point represents mean \pm SEM from five or six animals. Data are double plotted, with the dark phases indicated by the black bar. * $P < 0.05$ for peak compared with

trough. **B:** Colocalization of STAT3 (green) and GFAP (red) in mid-caudal division of the SCN demonstrates the expression of STAT3 predominantly in astrocytes. **C–E:** Representative photomicrographs show the cresyl violet staining to identify the SCN region (C) and maximum (ZT4; D) and minimum (ZT12; E) levels of STAT3 in coronal sections of SCN. Scale bars = 100 μ m in B; 100 μ m in E (applies to C–E). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

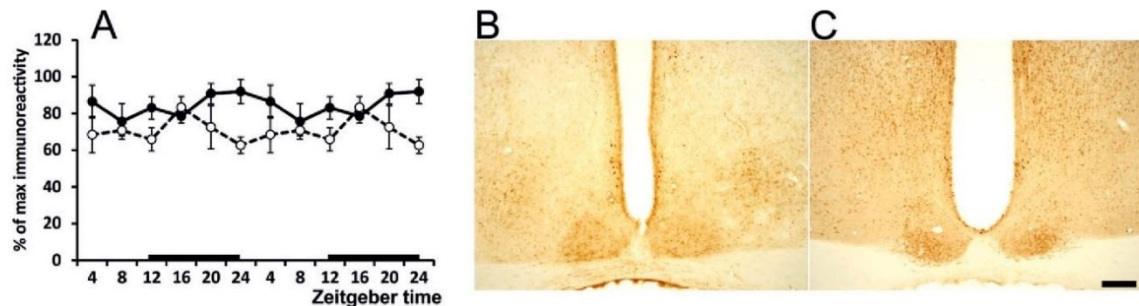


Fig. 2. Daily profiles of the STAT5A (solid circles) and STAT5B (open circles) isoforms show no rhythmic expression in the rat SCN. Data are percentages of maximal values in each assay. Each point represents mean \pm SEM of five or six animals. Data are double plotted, with the dark phases indicated by the black bar. **B,C:** Representative photomicrographs show the expression pattern of STAT5A (B) and STAT5B (C) at ZT8 in coronal sections of SCN. Scale bar = 200 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

$P = 0.0421$) and an interaction ($F[3,36] = 3.069$, $P = 0.0400$). Pairwise comparisons showed that the effect of time was different between 2 and 5 hr ($P = 0.0015$) and between 5 and 24 hr ($P = 0.0104$) after LPS application.

In contrast, LPS applied at ZT15 induced the pSTAT3 (Y705) 5 hr later ($F[7] = 38.457$, $P < 0.01$, one-way ANOVA), but, 24 hr after the application, the level of pSTAT3 (Y705) was similar to the level seen in

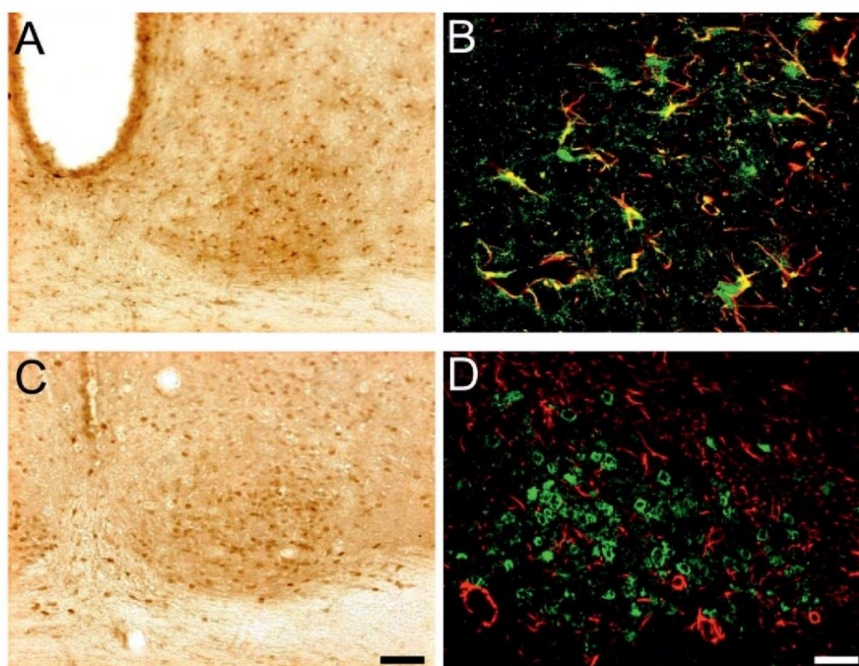


Fig. 3. Expression of STAT5A (A,B) and STAT5B (C,D) in the rat SCN. Representative photomicrographs show coronal sections of SCN stained with an anti-STAT5A antibody (A) and with an anti-STAT5B antibody (C). Colocalization of STAT5A (green) and GFAP (red) in the midcaudal SCN demonstrates the expression of STAT5A predominantly in astrocytes (B). In contrast, a magnification of the

midcaudal SCN stained with anti-STAT5B (green) shows no colocalization with GFAP (red) within individual cells (D). Scale bars = 100 μ m in C (applies to A,C); 50 μ m in D (applies to B,D). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

the control animals (Fig. 4A). A two-way ANOVA showed the significant effect of time ($F[1,36] = 37.700$, $P < 0.0001$) and treatment ($F[3,36] = 13.040$, $P < 0.0001$) and an interaction ($F[3,36] = 11.551$, $P < 0.0001$). Pairwise comparisons showed that the effect of time was different between 2 and 5 hr ($P = 0.0001$), between 5 and 8 hr ($P = 0.0201$), and between 5 and 24 hr ($P < 0.0001$) after LPS application. At 5 and 8 hr after LPS application at ZT6, the pSTAT3 (Y705) signal was spread around the hypothalamus with no obvious structural delineation, whereas, 24 hr after LPS application, the signal persisted only in the SCN and not in surrounding tissue (Fig. 4E–J). No similar effect was detected after the LPS was applied at ZT15, and the signal simply disappeared from the SCN at the same time that it disappeared from the surrounding tissue.

The level of pSTAT3 (S727) was significantly elevated 2 hr ($F[7] = 63.757$, $P < 0.01$, one-way ANOVA) and 5 hr ($F[7] = 24.903$; $P < 0.01$, one-way ANOVA) after the LPS injection at ZT6, but the LPS applied at ZT15 had no effect (Fig. 4B). A two-way ANOVA showed the significant effect of time $F[1,36] = 35.012$,

$P < 0.0001$ and treatment ($F[3,36] = 6.462$, $P = 0.0023$) and an interaction ($F[1,36] = 11.000$, $P < 0.0001$). Pairwise comparisons showed that the effect of time was different between 2 and 5 hr ($P = 0.0252$), between 2 and 8 hr ($P = 0.0004$), between 5 and 8 hr ($P = 0.0032$), and between 8 and 24 hr ($P = 0.0005$) after LPS application. As demonstrated by marked colocalization with the astrocyte-specific marker GFAP and 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI), both pSTAT3 (Y705) and pSTAT3 (S727) in the SCN were induced mostly in astrocytes and localized in the nucleus (Fig. 4C,D).

DISCUSSION

Our data show that, in the rat SCN, the expression of both STAT5 isoforms is constitutively high and that STAT3 shows daily oscillations of low but statistically significant amplitude under the light/dark regimen. Although we did not support the immunohistochemical data by mRNA analysis, the specificity of the antibodies used in our study is reliable, and their use as biomarkers in brain tissue is well established and trusted (see Bennett et al., 2005; Ma et al., 2005; Frontini et al., 2008).

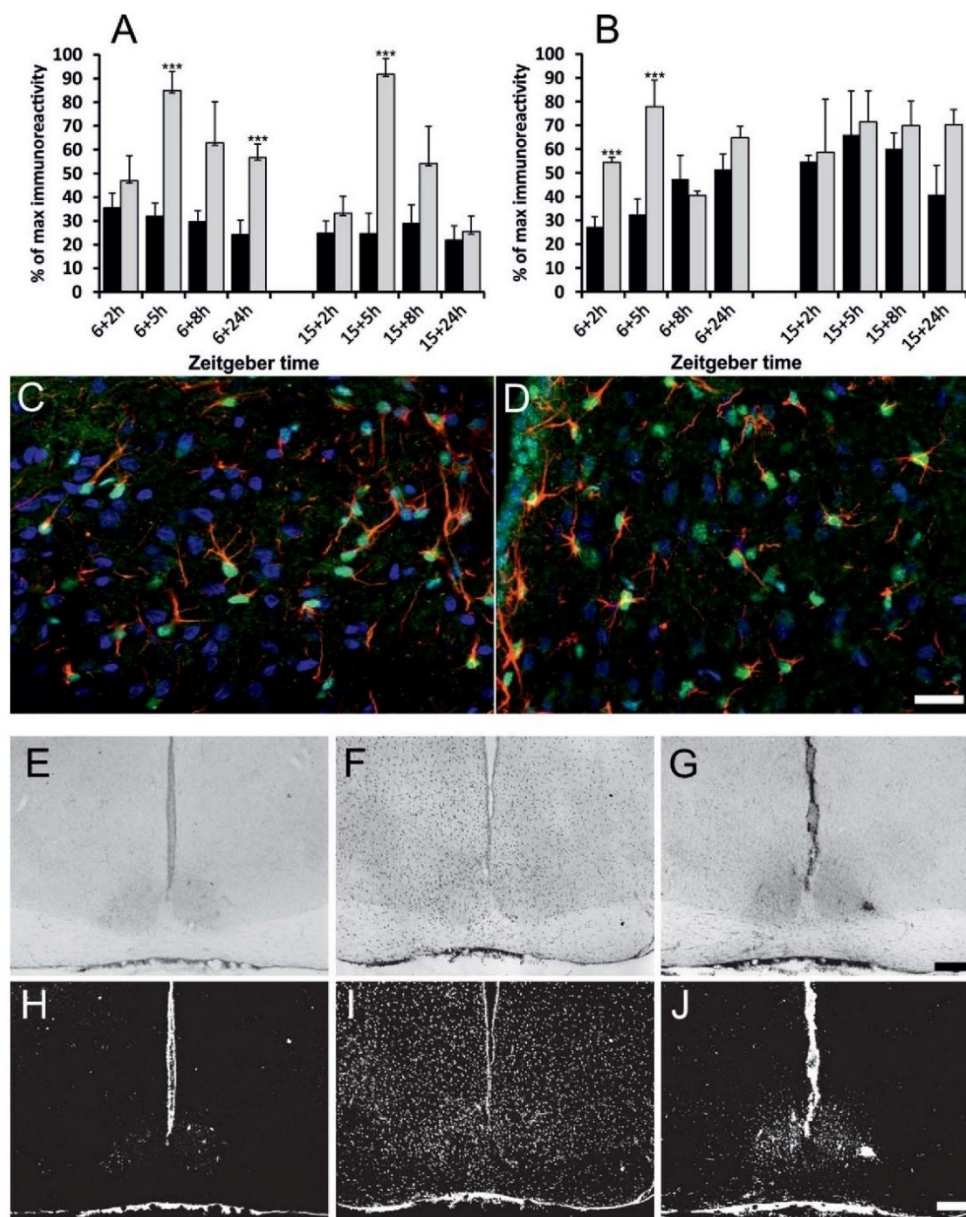


Fig. 4. Induction of STAT3 phosphorylation in the SCN by LPS (1 mg/kg). **A,B:** Numbers of pSTAT3 (Tyr705)-immunoreactive (-ir) cells (A) and pSTAT3 (Ser727)-ir cells (B) in the SCN of control animals (black columns) or after LPS administration at ZT6 or ZT15 and sampled 2, 5, 8, and 24 hr later (gray columns). Data are percentages of maximal values in each assay. Each point represents mean \pm SEM of four to six animals. *** $P < 0.01$, one-way ANOVA. **C,D:** High magnification of the ventrolateral SCN demonstrates colocalization of LPS-induced pSTAT3 (Tyr705; C) and pSTAT3 (Ser727; green; D)

with GFAP (red) within individual cells (blue, DAPI). **E-J:** Representative photomicrographs show coronal sections of SCN stained with an anti-pSTAT3 (Tyr705) antibody of the control animal (E,H), the animal 5 hr after LPS-administration at ZT6 (F,I), and the animal 24 hr after LPS administration at ZT6 (G,J). Scale bars = 50 μ m in D (applies to C,D); 200 μ m in G (applies to E-G); 200 μ m in J (applies to H-J). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

We cannot exclude the possibility that the daily STAT3 variation is a direct consequence of the light/dark cycle; however, the gradual increase of STAT3 level just before ZT0 suggests that this regulation may be driven by the circadian clock. The most relevant study with respect to the STAT signaling in the SCN reports on circadian expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in mice SCN (Sadki et al., 2007). In this study, the transcripts of SOCS1 and SOCS3 show low levels in the early night and high levels during the late night. The most well-understood role of SOCS3 is the inhibition of STAT3 activation by inhibition of Jak's catalytic activity (Sasaki et al., 1999; Yoshimura et al., 2007). However, SOCS is also one of the target genes of activated STAT3 (Howard et al., 2004; Ernst et al., 2009). Our data suggest that, under control conditions, the circadian variation of SOCS does not affect the STAT3 signaling in the SCN nor does pSTAT3 affect the level of SOCS, given that the basal levels of both phosphorylated STAT3 forms are low and nonrhythmic.

Colocalization of STAT5A and STAT5B with GFAP showed the astrocytic origin of STAT5A but not STAT5B. Not many studies have demonstrated the distinct location of STAT5A and STAT5B within cell types. No study exists that describes exclusive STAT5A expression in neurons, whereas a few studies have demonstrated specific STAT5B involvement without contribution of STAT5A in neuronal signaling processes (Bennett et al., 2005; Ma et al., 2005). Although we do not show directly the colocalization of STAT5B with neuronal markers, its exclusive nonastrocytic expression supports the presumption that STAT5B is of neuronal origin also in the SCN. STAT5B-dependent transcription in neurons has been shown to be specifically downregulated by cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 3 via NMDA receptor stimulation, thereby linking glutamatergic neurotransmission, which is also important for circadian clock function, with STAT5B signaling (Guido et al., 1999; Peng et al., 2010; Chao et al., 2012).

The important finding of the current study is that administration of LPS induced phosphorylation of STAT3 on Tyr705 and phosphorylation on Ser727. We tested daytime and nighttime administration because it has been shown that the susceptibility of organisms to the LPS can be affected by the circadian system, and the response of the organism may differ when the LPS is administered during the day vs. the night. For example, the septic dose of LPS (20 mg/kg) at ZT11 induces significantly higher mortality in mice compared with its application during the night at ZT19 (Marpegán et al., 2009). In contrast, rats treated with the repeated LPS dose of 200 µg/kg show enhanced behavioral tolerance when infected during the day compared with during the night (Franklin et al., 2007). Systematic low doses of LPS (50 µg/kg) given during the night at CT15 cause a phase delay of locomotor activity in mice but have no effect when applied at other times (Marpegán et al., 2005). Similarly, it has been shown that proinflammatory cytokine production and temperature response are higher when LPS is

applied during early night (Guerrero-Vargas et al., 2014). In the current study, we used 1 mg/kg of LPS, a dose that has been shown to suppress the expression of principal clock genes in the SCN, demonstrating that LPS can also alter the SCN function (Okada et al., 2008). Our results demonstrate that LPS induces pSTAT3 (Tyr705) in SCN astrocytes during both the day and the night but induces pSTAT3 (Ser727) only after the daytime application, suggesting that the day/night differences in responses to LPS can also be a property of the major circadian pacemaker itself.

Growing evidence supports the role of astrocytes in mediating the immune signals to the SCN (Leone et al., 2006; Duhart et al., 2013). The treatment of SCN astrocytes isolated in vitro with tumor necrosis factor- α (TNF- α) modulated the molecular clock of SCN astrocytes. The conditioned medium from these astrocytes also affected clock gene expression in other cells, and, when administered intracerebroventricularly, it induced phase shifts in a circadian locomotor activity, suggesting that LPS-induced phase delay may be mediated by astrocytic cells (Marpegán et al., 2005; Duhart et al., 2013). The TNF- α receptor (TNFR1) responsible for these effects is the predominant type of TNFR in astrocytes (Dopp et al., 1997). TNFR1 activates STAT3 by direct interaction with Jak and c-Src tyrosine kinases. Its interaction with Jak2 induces serine phosphorylation of STAT3 (Guo et al., 1998; Pincheira et al., 2008). Whether TNFR1 and Jak2 account for the daytime-specific LPS-induced pSTAT3 (Ser727) in the SCN is a difficult question; TNFR1 is higher during early night (Paladino et al., 2014), and the activity of Jak2 in the mammalian SCN has not been studied. Another mechanism of diverse STAT3 phosphorylation may begin at purinergic receptors. In a cortical culture of astrocytes, the stimulation of purinergic receptors P2Y and P2X leads to phosphorylation of STAT3. Although both receptors stimulated STAT3 phosphorylation on Tyr705, only P2Y augmented STAT3 phosphorylation on Ser727 (Washburn and Neary, 2006). Both purinergic receptors have been well described also for the SCN (Bhattacharya et al., 2013), but whether different day/night intrinsic states of P2Y receptors in the SCN underlie the selective LPS-induced pSTAT3 (Ser727) only during the daytime remains to be elucidated. Additionally, various other kinases, including MAPK, protein kinase C δ , mTOR, and mitogen- and stress-activated kinase MSK1, have been shown to phosphorylate STAT3 on Ser727 in different systems (Yokogami et al., 2000; Wierenga et al., 2003; Xiong et al., 2014) and may provide an input path for circadian regulation in the SCN.

In different structures of the brain, the LPS daytime administration caused the nuclear translocation of STAT3, which occurred within 4 hr and declined 8 hr after LPS treatment (Gautron et al., 2002). Because nuclear translocation requires STAT3 (Tyr705) phosphorylation, it corresponds well with the dynamics of pSTAT3 (Tyr705) levels in the tissue surrounding the SCN observed in the current study. The prolonged

pSTAT3 (Tyr705) level in response to LPS seems to be a unique property of the SCN astrocytes, although neither the cause nor the consequence of this time difference can be readily explained. A few other indices also suggest a prolonged effect of the LPS in the SCN. For example, LPS applied during the daytime upregulated the p65 subunit of the nuclear factor- κ B transcription complex and immediate early gene c-Fos in the SCN 24 hr later. The suppression of clock gene expression in the SCN also occurred only within the next circadian cycle from LPS administration during the day (Okada et al., 2008; Beynon and Coogan, 2010). Whether the nighttime LPS would have evoked the distinct dynamics of these responses has not been demonstrated.

Activation of STAT3 by phosphorylation in astrocytes is considered to be an integral component of astrocytic responses to traumatic brain injury leading to astrogliosis and acute neuroinflammation (O'Callaghan et al., 2014). The conditional deletion of STAT3 from astrocytes suggests that STAT3 signaling is involved in astrocytes' ability to protect neural tissue from neurotoxicity (Herrmann et al., 2008; Sarafian et al., 2010). It is possible that the elevated level of STAT3 protein and its activation by phosphorylation on both amino acids correspond with higher daytime activity of suprachiasmatic astrocytes (Leone et al., 2006). This may lead to more efficient protection of the circadian clock during the daytime and underlie the day/night difference in the SCN response to LPS application and clock-driven physiology.

In summary, this study shows the daily rhythm of STAT3 protein in the rat SCN, with low but significant amplitude peaking in the morning. We also reveal the strong nonrhythmic expression of STAT5A in astrocytes and the STAT5B signal in nonastrocytic cells of the SCN. Administration of LPS acutely induced pSTAT3 (Tyr705) during both the day and the night, and induced pSTAT3(Ser727) as well but only after the daytime application. It is important to note that the LPS-induced pSTAT3 (Tyr705) remained elevated for 24 hr after the daytime application but declined within 8 hr when LPS was applied at night.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: ZB. Acquisition of data: SM (performed immunohistochemistry, cell counts, and statistical analysis and participated in animal experiments), DP (performed the majority of animal experiments), and KČ (performed fluorescent staining and confocal microscopy). Preparation of the manuscript: ZB.

REFERENCES

- Bendová Z, Sládek M, Svobodová I. 2012. The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. *Neurochem Int* 61:43–47.
- Bennett E, McGuinness L, Gevers EF, Thomas GB, Robinson IC, Davey HW, Luckman SM. 2005. Hypothalamic STAT proteins: regulation of somatostatin neurones by growth hormone via STAT5b. *J Neuroendocrinol* 17:186–194.
- Beynon AL, Coogan AN. 2010. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1 β and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int* 27:1546–1563.
- Bhattacharya A, Vavra V, Svobodová I, Bendová Z, Vereb G, Zemkova H. 2013. Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 33:8035–8044.
- Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzl H. 2009. Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One* 4:e4882.
- Brancaccio M, Maywood ES, Chesham JE, Loudon AS, Hastings MH. 2013. A Gq-Ca²⁺ axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 78:714–728.
- Buntin JD, Buntin L. 2014. Increased STAT5 signaling in the ring dove brain in response to prolactin administration and spontaneous elevations in prolactin during the breeding cycle. *Gen Comp Endocrinol* 200:1–9.
- Butcher GQ, Lee B, Cheng HY, Obrietan K. 2005. Light stimulates MSK1 activation in the suprachiasmatic nucleus via a PACAP-ERK/MAP kinase-dependent mechanism. *J Neurosci* 25:5305–5313.
- Cao R, Lee B, Cho HY, Saklayen S, Obrietan K. 2008. Photoregulation of the mTOR signaling pathway in the suprachiasmatic circadian clock. *Mol Cell Neurosci* 38:312–324.
- Cermakian N, Lange T, Golombek D, Sarkar D, Nakao A, Shibata S, Mazzocchi G. 2013. Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiol Int* 30:870–888.
- Chao HW, Lai YT, Lu YL, Lin CL, Mai W, Huang YS. 2012. NMDAR signaling facilitates the IPO5-mediated nuclear import of CPEB3. *Nucleic Acids Res* 40:8484–8498.
- Chatterjee-Kishore M1, van den Akker F, Stark GR. 2000. Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol* 10:106–111.
- Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40:178–186.
- Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE. 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75:104–112.
- Duhart JM, Leone MJ, Paladino N, Evans JA, Castanon-Cervantes O, Davidson AJ, Golombek DA. 2013. Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- α . *J Immunol* 191:4656–4664.
- Ernst MB, Wunderlich CM, Hess S, Pachler M, Mesaros A, Koralov SB, Kleinriders A, Husch A, Münzberg H, Hampel B, Alber J, Kloppenburg P, Brüning JC, Wunderlich FT. 2009. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J Neurosci* 29:11582–11593.
- Franklin AE, Engeland CG, Kavaliers M, Ossenopp KP. 2007. The rate of behavioral tolerance development to repeated lipopolysaccharide treatments depends upon the time of injection during the light-dark cycle: a multivariable examination of locomotor activity. *Behav Brain Res* 180:161–173.
- Frontini A, Bertolotti P, Tonello C, Valerio A, Nisoli E, Cinti S, Giordano A. 2008. Leptin-dependent STAT3 phosphorylation in postnatal mouse hypothalamus. *Brain Res* 1215:105–115.
- Gautron L, Lafon P, Chaigniau M, Tramu G, Layé S. 2002. Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* 112:717–729.

- Girardet C, Lebrun B, Cabirol-Pol MJ, Tardivel C, François-Bellan AM, Becquet D, Bosler O. 2013. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling regulates daily astroglial plasticity in the suprachiasmatic nucleus: electron-microscopic evidence in mouse. *Glia* 61:1172–1177.
- Golombek DA, Rosenstein RE. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063–1102.
- Grosbellet E, Goumelen S, Pévet P, Criscuolo F, Challet E. 2015. Leptin normalizes photic synchronization in male ob/ob mice, via indirect effects on the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 156:1080–1090.
- Guerrero-Vargas NN, Salgado-Delgado R, Basualdo Mdel C, García J, Guzmán-Ruiz M, Carrero JC, Escobar C, Buijs RM. 2014. Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 273:22–30.
- Guido ME, de Guido L, Goguen D, Robertson HA, Rusak B. 1999. Differential effects of glutamatergic blockade on circadian and photic regulation of gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 67:247–257.
- Guo D, Dunbar JD, Yang CH, Pfeffer LM, Donner DB. 1998. Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *J Immunol* 160:2742–2750.
- Gupta S, Mishra K, Suroliya A, Banerjee K. 2011. Suppressor of cytokine signalling-6 promotes neurite outgrowth via JAK2/STAT5-mediated signalling pathway, involving negative feedback inhibition. *PLoS One* 6:e26674.
- He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE. 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* 8:616–625.
- He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, et al. 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *J Biol Chem* 280:33426–33434.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. 2008. STAT3 is a critical regulator of astroglialosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231–7243.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734–738.
- Jakubcakova V, Oster H, Tamanini F, Cadenas C, Leitges M, van der Horst GT, Eichele G. 2007. Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron* 54:831–843.
- Kim YI, Choi HJ, Colwell CS. 2006. Brain-derived neurotrophic factor regulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci Res* 84:1512–1520.
- Kiu H, Nicholson SE. 2012. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 30:88–106.
- Leone MJ, Marpegán L, Bekinshtein TA, Costas MA, Golombek DA. 2006. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *J Neurosci Res* 84:1521–1527.
- Ma FY, Anderson GM, Gunn TD, Goffin V, Grattan DR, Bunn SJ. 2005. Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology* 146:5112–5119.
- Markham K, Schuurmans C, Weiss S. 2007. STAT5A/B activity is required in the developing forebrain and spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 35:272–282.
- Marpegán L, Bekinshtein TA, Costas MA, Golombek DA. 2005. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J Neuroimmunol* 160:102–109.
- Marpegán L, Leone MJ, Katz ME, Sobrero PM, Bekinshtein TA, Golombek DA. 2009. Diurnal variation in endotoxin-induced mortality in mice: correlation with proinflammatory factors. *Chronobiol Int* 26:1430–1442.
- Moore RY. 2013. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci* 119:1–28.
- Nakano Y, Furube E, Morita S, Wanaka A, Nakashima T, Miyata S. 2015. Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *J Neuroimmunol* 278:144–158.
- Nicolas CS, Peineau S, Amici M, Csaba Z, Fafouri A, Javalet C, Collett VJ, Hildebrandt L, Seaton G, Choi SL, Sim SE, Bradley C, Lee K, Zhuo M, Kaang BK, Gressens P, Dournaud P, Fitzjohn SM, Bortolotto ZA, Cho K, Collingridge GL. 2012. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 73:374–390.
- O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, Sofroniew MV, Miller DB. 2014. Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9:e102003.
- Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, Nakayama M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Ishida N, Monden M. 2008. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *J Surg Res* 145:5–12.
- Pačesová D, Volfová B, Červená K, Hejnová L, Novotný J, Bendová Z. 2015. Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol* 172:3638–3649.
- Paladino N, Mul Fede ML, Duhart JM, Marpegán L, Golombek DA. 2014. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- α . *Chronobiol Int* 31:668–679.
- Pellegrino MJ, Habecker BA. 2013. STAT3 integrates cytokine and neurotrophin signals to promote sympathetic axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* 56:272–282.
- Peng SC, Lai YT, Huang HY, Huang HD, Huang YS. 2010. A novel role of CPEB3 in regulating EGFR gene transcription via association with Stat5b in neurons. *Nucleic Acids Res* 38:7446–7457.
- Pincheira R, Castro AF, Ozes ON, Idumalla PS, Donner DB. 2008. Type 1 TNF receptor forms a complex with and uses Jak2 and c-Src to selectively engage signaling pathways that regulate transcription factor activity. *J Immunol* 181:1288–1298.
- Pircher TJ, Petersen H, Gustafsson JA, Haldosén LA. 1999. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol Endocrinol* 13:555–565.
- Ptitsyn AA, Gimble JM. 2007. Analysis of circadian pattern reveals tissue-specific alternative transcription in leptin signaling pathway. *BMC Bioinformatics* 8(Suppl 7):S15.
- Rajan P. 2011. STATs and context within the mammalian nervous system. *Mol Med* 17:965–973.
- Sadki A, Bentivoglio M, Kristensson K, Nygård M. 2007. Suppressors, receptors, and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiol Aging* 28:296–305.
- Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, Sofroniew MV. 2010. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One* 5:e9532.
- Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A. 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4:339–351.
- Timofeeva OA, Tarasova NI. 2012. Alternative ways of modulating JAK-STAT pathway: looking beyond phosphorylation. *JAKSTAT* 1:274–284.
- Wang Z, Bunting KD. 2013. STAT5 in hematopoietic stem cell biology and transplantation. *JAKSTAT* 2:e27159.
- Washburn KB, Neary JT. 2006. P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience* 142:411–423.

- Watson CJ, Burdon TG. 1996. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Rev Reprod* 1:1–5.
- Wierenga AT, Vogelzang I, Eggen BJ, Vellenga E. 2003. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol* 31:398–405.
- Wunderlich CM, Hövelmeyer N, Wunderlich FT. 2013. Mechanisms of chronic JAK–STAT3–SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* 2: e23878.
- Wyszomierski SL, Rosen JM. 2001. Cooperative effects of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and C/EBPβ (CCAAT/enhancer-binding protein-β) on beta-casein gene transcription are mediated by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 15:228–240.
- Xiong A, Yang Z, Shen Y, Zhou J, Shen Q. 2014. Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer prevention. *Cancers* 6: 926–957.
- Yang J, Stark GR. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18:443–451.
- Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. 2000. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 10: 47–50.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. 2007. SOCS proteins, cytokine signaling, and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454–465.

10.2. Příloha B

The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus

2018

PLOS One; 13:9; 1-16

Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., Bendová, Z.

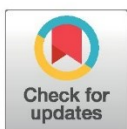
RESEARCH ARTICLE

The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus

Simona Moravcová^{1,2}, Dominika Pačesová^{1,2}, Barbora Melkes¹, Hana Kyclerová¹, Veronika Spišská¹, Jiří Novotný¹, Zdenka Bendová^{1,2*}

1 Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic, **2** Department of Sleep Medicine and Chronobiology, National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic

* zdenka.bendova@natur.cuni.cz



OPEN ACCESS

Citation: Moravcová S, Pačesová D, Melkes B, Kyclerová H, Spišská V, Novotný J, et al. (2018) The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. PLoS ONE 13(9): e0199405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405>

Editor: Henrik Oster, University of Lübeck, GERMANY

Received: May 31, 2018

Accepted: September 17, 2018

Published: September 28, 2018

Copyright: © 2018 Moravcová et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Charles University Grant Agency no. 361115 (SM); by the Czech Science Foundation, contract grant number 18-08423S (ZB), and by institutional project no. LO1611 with financial support from the MEYS under the NPU I programme. The funders had no

Abstract

The circadian clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) regulates daily rhythms in physiology and behaviour and is an important part of the mammalian homeostatic system. Previously, we have shown that systemic inflammatory stimulation with lipopolysaccharide (LPS) induced the daytime-dependent phosphorylation of STAT3 in the SCN. Here, we demonstrate the LPS-induced *Stat3* mRNA expression in the SCN and show also the circadian rhythm in *Stat3* expression in the SCN, with high levels during the day. Moreover, we examined the effects of LPS (1mg/kg), applied either during the day or the night, on the rhythm in locomotor activity of male Wistar rats. We observed that recovery of normal locomotor activity patterns took longer when the animals were injected during the night. The clock genes *Per1*, *Per2* and *Nr1d1*, and phosphorylation of kinases ERK1/2 and GSK3 β are sensitive to external cues and function as the molecular entry for external signals into the circadian clockwork. We also studied the immediate changes in these clock genes expressions and the phosphorylation of ERK1/2 and GSK3 β in the suprachiasmatic nucleus in response to daytime or night-time inflammatory stimulation. We revealed mild and transient changes with respect to the controls. Our data stress the role of STAT3 in the circadian clock response to the LPS and provide further evidence of the interaction between the circadian clock and immune system.

Introduction

The temporal organisation of behavioural and physiological functions in mammals mostly depends on the timing signals generated by the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN integrates external timing cues with an endogenous molecular clockwork and synchronises circadian oscillations in other brain parts and peripheral tissues [1]. The morphology of the SCN varies across species, but its basic structure is shared by all mammals. It consists of two main parts: the shell or the dorsomedial part (dmSCN), which contains

role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

intrinsically rhythmic cells, and the core or the ventrolateral part (vLSN), which receives most of the regulatory inputs from other parts of the brain [2]. The molecular basis of a circadian clock involves several interlocking transcriptional loops of clock genes, such as *Clock*, *Bmal1*, *Period 1* (*Per1*), *Per2*, *Cryptochrome 1* (*Cry1*) and *Cry2*, *Casein kinase 1 epsilon* (*CK1ε*), *RevErbα* (*Nr1d1*) and *Rora*. The stability of these loops is supported by posttranslational modifications of clock protein by several kinases, including glycogen synthase kinase-3β (GSK3β) and p42/44 mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) [3–7]. This kinase also plays a role in photic entrainment of the circadian clock in the SCN [8, 9]; thus, it is an integral part of the circadian clock in the SCN.

Many studies have demonstrated that the susceptibility of organisms to inflammatory stimuli is strongly influenced by the SCN and that the immune responses differ in their strength, depending not only on the dose of the pathogen but also on the time of infection. Recently, Kiessling et al. [10] reported reduced footpad swelling and the lowest immune cell recruitment when mice were infected with *Leishmania* parasitic during the early subjective day, compared to the late day or even the subjective night. This difference was apparently driven by a day-time-dependent neutrophil and anti-inflammatory macrophage infiltration to the infection site, which was regulated by the circadian clock. Furthermore, lipopolysaccharide (LPS) administration induces higher levels of proinflammatory cytokines and chemokines in a serum if mice are injected at the transition point between their rest and activity phases of the day than between the activity and rest phases at the beginning of the light phase of the day [11, 12]. The circadian regulation of immune functions is also supported by the observations that the dysfunction of the timing system by either ablation of the SCN or by forced desynchronization severely perturbs the immune system. The SCN lesion enhances the level of LPS-induced corticosterone [13], modulates the temperature response to the LPS and markedly enhances tumour necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin (IL-6) plasma levels after LPS treatment [12, 14]. Mice exposed to chronic jet lag showed increased LPS-induced mortality compared to non-shifted controls [15].

The current research also focuses on the reciprocal relationship between the immune system and the circadian clock. It has been shown that the LPS upregulates the p65 subunit of NF-κB transcription complex and immediate early-gene *c-Fos* in the SCN [16–18]. Other reports have suggested that the LPS-induced circadian responses are mediated by Toll-like receptor 4 (TLR4) [19] and that the TNF-α and chemokine CCL2 mediate the signalling of peripheral LPS application into the SCN via changes of molecular clock in SCN astrocytes [20–22]. The inflammatory signalling pathways in the brain mostly converge on the activation of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) [23]. In our previous study, we demonstrated the daytime-dependent LPS-induced phosphorylation of STAT3 on Tyr705 and Ser727 in the SCN astrocytes [24]. In the present study, we examine the daytime-dependent effect of peripheral LPS on the expression of the *Stat3* gene in the SCN. To detect a possible impact on the clockwork mechanisms, we assessed the expression of clock genes *Per1*, *Per2* and *Nr1d1*, which are sensitive to external cues and function as the molecular entry for external signals into the circadian clockwork. The phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2) and GSK3β (pGSK3β) play roles in stabilizing the clockwork mechanism, show specific expression patterns in the SCN and time-of-day-dependent response to morphine [25] and are even involved in STAT3 signalling [26, 27]. Therefore, we also detected their response to LPS administration in the SCN by immunohistochemistry. We initially measured locomotor activity in our study to control for overall sickness after the LPS treatment. Interestingly, the rate of the physical recovery over the following days differed according to the time of LPS administration.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (Velaz Ltd., Koleč, Czech Republic) were maintained under a 12-hr light-dark regimen (with lights on from 06:00 to 18:00) at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ with free access to food and water for at least 2 weeks before the experiment. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Animal Protection Law of the Czech Republic (Protocol Number: MSMT-23852/2014-14). All sacrifice was performed by rapid decapitation under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Locomotor activity measurement

The locomotor activity of 20 rats was monitored using infrared motion detectors (Mini-Mitter VitalView data acquisition system) for three days before the experiment, which served as an internal control for total activity, acrophase and amplitude. On the day of the experiment (designated as LD 0), 10 rats received an intraperitoneal injection of LPS (from *E. coli*, strain 055:B5; 1 mg/kg; Sigma Aldrich; dissolved in distilled water) at ZT6, as did 10 rats at ZT15. Activity counts accumulated over a 1-h period were fitted with single cosine curves, as described by Soták et al. [28] and Hahnová et al. [29] and were analysed with GraphPad Prism version 6.00. The acrophase and amplitude were indicated from cosine waves. The data were plotted as the mean of 10 animals.

Experimental design

Circadian rhythm of *Stat3* mRNA

Adult male rats were released into constant darkness at the time of dark-to-light transition (designated as circadian time 0; CT0). During the first cycle in darkness, the animals were sacrificed by rapid decapitation at 3-h intervals ($n = 3-4$); their brains were frozen on dry ice and stored at -80°C .

Effect of LPS on levels of *Stat3* and clock genes mRNA, pERK1/2 and pGSK3 β

Adult rats received an intraperitoneal injection of LPS (1 mg/kg) at ZT 6 or ZT 15. Time was expressed as Zeitgeber time (ZT), with ZT0 corresponding to the time of lights on and ZT12 corresponding to the time of lights off. The control animals received saline. Four experimental and four control animals were anesthetized with thiopental 2, 5, 8 and 24 hr later and were either killed by rapid decapitation for gene expression assessment by in situ hybridization or perfused through the ascending aorta with 4% paraformaldehyde in PBS, as described before [30], for immunohistochemical detection of pERK1/2 and pGSK3 β .

In situ hybridisation

The cDNA fragments of rat *Stat3*, *Per1*, *Per2* and *Nr1d1* were used as templates for the in vitro transcription of complementary RNA probes (SP6/T7 MAXIscript kit, Applied Biosystems, Austin, TX, USA). The probes were labelled by [α -35S]-UTP (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA) and purified using Chroma-Spin 100-DEPC H₂O columns (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA). In situ hybridisation was performed as described by Matějů et al. [31]. For each gene, brain sections from control and experimental

rats were processed simultaneously under identical conditions. Autoradiographs were analysed using NIH Image J software to detect the relative optical density (OD) of the specific hybridisation signal. In each animal, the signal was quantified bilaterally at the mid-caudal SCN section. Each measurement was corrected for nonspecific background by subtracting the OD values from the adjacent area in the hypothalamus with a consistently low OD. The OD values for each animal were calculated as a mean of values for the left and right SCN.

Quantitative real time RT-PCR

The brains were sectioned into a series of 20- μ m-thick coronal slices throughout the rostral-caudal extent of the SCN. The slices were stained with ethanolic cresyl violet for 60 sec, and SCN regions were isolated using laser microdissection (LMD 6000; Leica) and immediately homogenised in RLT buffer (RNeasy Plus Micro kit; Qiagen). Total RNA was extracted with the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. We converted 1 μ g of total RNA to cDNA using two-step Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. TaqMan[®] PreAmp Master Mix (Life Technologies) was used to pre-amplify small amounts of cDNA after reverse transcription. Samples of pre-amplified cDNA (1 μ l) were amplified in 20 μ l of PCR reaction mixture containing 5x HOT FIREPol[®] Probe qPCR Mix Plus (Baria) plus TaqMan probes (Life Technologies) for rat *Stat3* gene (Rn00680715_m1) and housekeeping gene *Actb* (Rn00667869_m1). All of the qPCRs were performed in duplicate on a LightCycler[®] 480 Instrument (Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA) using the following temperature profile: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 60 cycles consisting of denaturation at 95°C for 18 secs and annealing/elongation at 60°C for 60 sec. The mean of the crossing point (Cp) obtained from qPCR was normalised to the level of housekeeping gene *Actb* and then used to analyse relative gene expression by the $\Delta\Delta$ CT method [32].

Immunohistochemistry

The brains were sectioned into a series of 30- μ m-thick free-floating coronal slices throughout the rostral-caudal extent of the SCN. The levels of phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) and pGSK3 β (Ser9) (antibodies purchased from Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA) were assessed by immunohistochemistry using the avidin/biotin method with diaminobenzidine as the chromogen (Vectastain ABC Kit, Vector, Burlingame, CA, USA). All brain sections were processed simultaneously under identical conditions. Immunopositive cells in the SCN mid-caudal region were manually tagged and counted using an image-analysis system (NIH Image J software). To delineate the position of the ventrolateral and dorsomedial SCN, the boundaries of the pERK1/2 signal at ZT15 and ZT6, respectively, were saved as regions of interest and applied to all immunohistochemical images. The data were expressed as the means of values from the left and right SCN.

Statistical analysis

The data were expressed as the mean of the values from the left and right SCN and as the mean \pm SEM of the number of animals per time point. The data were analysed by multiple t-tests, with the Sidak-Bonferroni method used for statistical significance. Two-way ANOVAs were performed to compare trends in the total activity, acrophase and amplitude of rhythms in the locomotor activity between groups. The circadian profile of *Stat3* mRNA levels and locomotor activity rhythmicity were analysed by a one-way ANOVA for the time differences. $P < 0.05$ was required for significance. Moreover, the circadian profiles were fitted with single

cosine curves [28, 30], defined by the equation: $[Y = \text{mesor} + (\text{amplitude} * \cos(2 * \pi * (X - \text{acrophase}) / \text{wavelength})]$ with a constant wavelength of 24 h.

Results

The recovery of locomotor activity from systemic LPS depends on the time of its administration

To monitor the recovery from acute infection in natural conditions, we measured the locomotor activity of rats for eight consecutive LD cycles following the systemic LPS administration on LD 0 (Fig 1). The monitoring for three cycles before LPS treatment served as an internal control for each group (plotted only the last day before the treatment; Fig 1A). During these days, the mean sum of activity counts per day (total activity) was 3632 for the rat group that was later treated with LPS at ZT6 and 3536 for the group that was later treated at ZT15 (Fig 1B). The amplitude was 149.3 counts/h for the ZT6 group and 150 counts/h for the ZT15 group. The two-way ANOVA revealed a significant difference between the amplitudes of both groups in the first day after their LPS treatment (LD1; $F(1, 445) = 22.31$; $P < 0.0001$), second day (LD2; $F(1, 450) = 6.302$; $P = 0.0124$), third day (LD3; $F(1, 450) = 19.14$; $P < 0.0001$) and fourth day (LD4; $F(1, 450) = 16.7$; $P < 0.0001$) (Fig 1A). One-way ANOVA confirmed the significant rhythmicity in both groups already on LD1 (ZT6 group, $F(24, 213) = 21.31$; $P < 0.0001$; ZT15 group, $F(24, 213) = 3.624$; $P < 0.0001$). Although the two-way ANOVA did not confirm the difference between groups in total activity, the pairwise comparisons revealed a significant difference between total activity values on LD3 ($P = 0.0014$) (Fig 1B). The two-way ANOVA revealed a significant difference between both groups in the gradual recovery of amplitude ($F(1, 8) = 10.56$; $P = 0.0117$) and thus confirmed that the recovery of locomotor activity was faster in animals treated with LPS during the day than during the night.

Circadian rhythmicity of Stat3 expression and the time-dependent effect of acute LPS on its mRNA level in the rat SCN

We performed *in situ* hybridisation of the SCN sections to determine whether the mRNA expression of *Stat3* would show similar circadian rhythmicity as the STAT3 protein [24]. One-way ANOVA revealed that under DD conditions, the *Stat3* mRNA expressed circadian rhythm in the SCN ($P = 0.0012$; Fig 2). The cosinor analyses also confirmed a significant circadian rhythmicity ($R^2 = 0.5327$, $P < 0.0002$).

To reveal the effect of acute LPS on the *Stat3* expression, animals were injected with LPS at ZT6—the time of increasing *Stat3* endogenous expression—and at ZT15—the time of minimum *Stat3* expression in the SCN. We performed *in situ* hybridisation and revealed that when LPS was applied during the day, the level of *Stat3* mRNA did not change significantly until the 8 h from the injection ($P = 0.0006$), while when applied at ZT15, it markedly induced the *Stat3* transcription 2 h ($P = 0.0004$) and 5 h ($P = 0.0056$) after application (Fig 3A). In the nighttime, the LPS induced the *Stat3* mRNA of 11 ± 0.86 times of the control values in 2 h, and 2.7 ± 0.37 times in 5 h (Fig 3D). To verify the results obtained from *in situ* hybridisation, we checked the day/night difference in LPS effect at one time point using RT-PCR from the SCN isolated by laser dissection (Fig 3B and 3C). Multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni method showed that the mRNA level increased significantly after LPS at both ZT6 ($P = 0.0091$) and ZT15 ($P = 0.0096$). However, in the daytime, the LPS induced the *Stat3* mRNA of only 1.417 ± 0.1598 times of the control values, but LPS applied at ZT15 increased the *Stat3* mRNA 15.8 ± 2.6 times (Fig 3E). This result thus corresponds with the data obtained by *in situ* hybridization and confirms that the *Stat3* expression would show greater LPS-induced increase during the

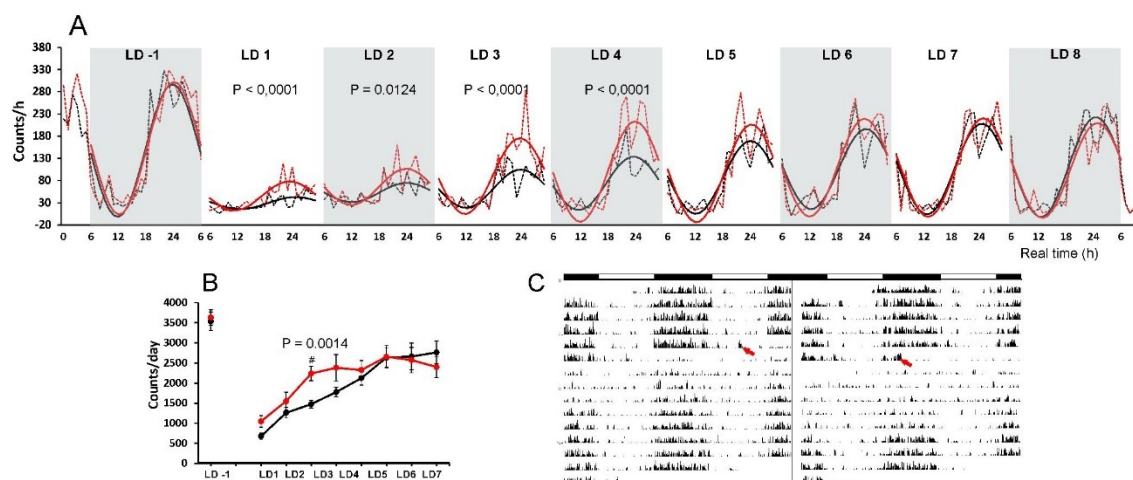


Fig 1. The recovery of normal locomotor activity patterns took longer when the animals were injected during the night. (A) The changes in locomotor activity one day before (LD-1) and 8 days after (LD1–LD8) the LPS (1 mg/kg) was applied at ZT6 (i.e., at real time (RT)12; red line) or ZT15 (i.e., at real time 21 (RT)21; black line) and administered at LD 0 (not plotted). The mean total activity counts during the 1-hr period were plotted (dotted lines) along with the population cosine wave for better resolution of the difference (full lines). The two-way ANOVA results for significance are shown. (B) The total activity counts per day, which show slower recovery by the animals injected at ZT15 compared to the animals injected at ZT6. (C) The representative actograms of animal injected at ZT6 (on the left) and at ZT15 (on the right). The times of LPS administration are indicated with red arrows.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405.g001>

night apparently due to the low endogenous mRNA level during the night (Fig 2). The significant difference between the day and night control groups ($P < 0.0001$; Fig 3B) confirms the day/night difference of *Stat3* expression revealed by optic density measurements of *in situ* autoradiographs (Fig 2).

Time-dependent effect of acute LPS on the clock gene level in rat SCN

In the clockwork machinery, the genes *Per1*, *Per2* and *Nr1d1* best reflect the immediate changes in the external environment of the clock. To reveal whether the acute LPS may affect the clockwork mechanism distinctly depending on the time of day, we followed the changes in the expression of these clock genes in the SCN by *in situ* hybridisation. The clock genes show

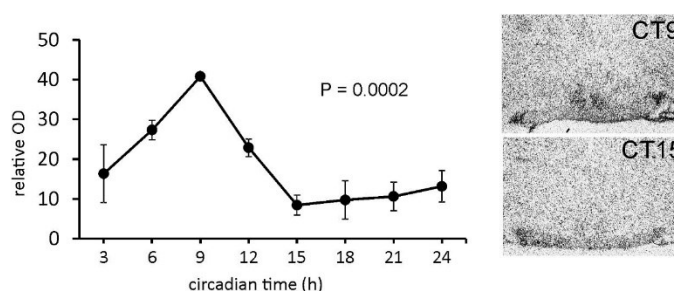


Fig 2. Rhythmic expression of *Stat3* mRNA in the rat SCN. The data are expressed as relative optical density values of the specific hybridisation signal. Each point represents the mean \pm SEM from 3–4 animals. The P-value represents the significance of circadian rhythmicity revealed by the cosinor analyses. Representative photomicrographs of coronal sections of the SCN, probed for *Stat3* mRNA, which demonstrate the highest- and lowest-intensity hybridisation signal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405.g002>

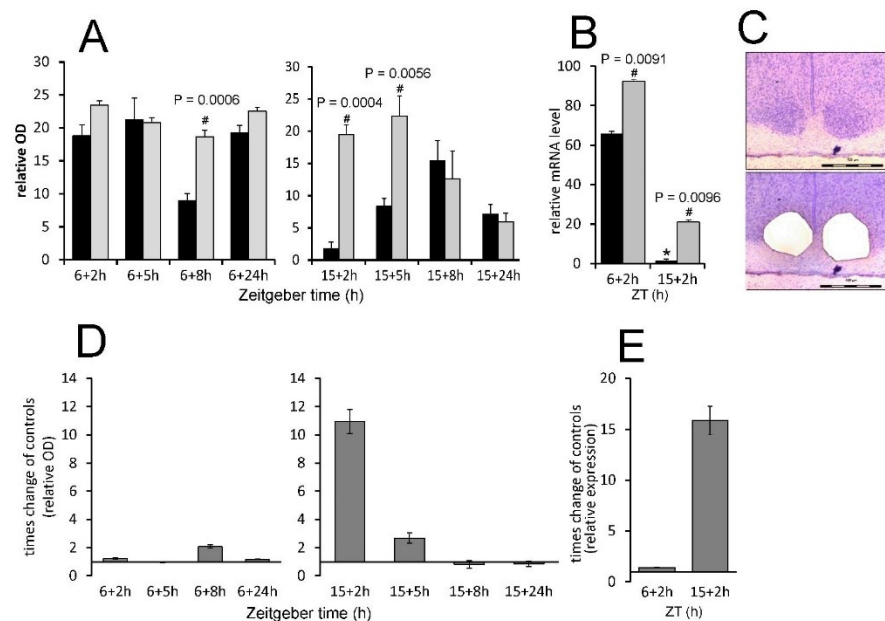


Fig 3. LPS-induced changes in *Stat3* gene expression in rat SCN. Adult rats were injected with LPS (1 mg/kg) either during the day at ZT6 or at night at ZT15 and were sampled 2 h, 5 h, 8 h and 24 h later (grey columns) (controls; black columns). (A) The levels of *Stat3* mRNA were assessed via the intensity of the hybridisation signal. Each column represents the mean of four values \pm SEM. (B) The transcription level of *Stat3* was determined using quantitative RT-PCR, and the normalised values were converted to a percentage of the maximum value of the transcript. Each point represents the mean \pm SEM of 3 animals. # P: The value of multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni post-hoc test. (C) Representative photomicrographs of coronal sections of the SCN demonstrate the area of laser dissection of the SCN. Scale bar = 400 μ m. (D, E) The data from A (B resp.) plotted as a LPS-induced times change in the *Stat3* expression compared to controls show the direct effect of LPS regardless of the daily gene oscillations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405.g003>

high-amplitude circadian rhythmicity in their expression. To extract the direct effect of LPS from the clock-controlled genes transcription, we plotted the data as the times difference between values from LPS-treated groups and controls. The real values are summarized in [S1 Fig](#). As shown in [Fig 4A](#), a significant reduction of *Per1* mRNA was observed 24 h after the daytime LPS application ($P = 0.0024$). A significant induction of *Per2* was observed 8 h after daytime LPS application ($P = 0.0131$) ([Fig 4B](#)). No differences between the control groups and LPS-treated animals were detected for *Per1* and *Per2* expression in the SCN after the night-time application. In contrast, the level of *Nr1d1* was upregulated 8 h after the night-time LPS injection ($P = 0.0019$) but was not affected by the LPS applied at ZT6 ([Fig 4C](#)).

Time-dependent effect of acute LPS on pERK1/2 and pGSK3 β levels in rat SCN

The phosphorylation state of both kinases shows significant circadian rhythmicity in the SCN. To better distinguish the effect of LPS from the clock-controlled baseline levels, we plotted the data as the times difference between values from LPS-treated groups and controls. The real values are summarized in [S2 Fig](#). The acute application of LPS at a dose of 1 mg/1kg showed opposite effects on pERK1/2 levels when applied during the day versus the night. LPS applied at ZT6 significantly induced pERK1/2 in the vSCN within 2 h ($P = 0.0190$) ([Fig 5A](#)) and in the

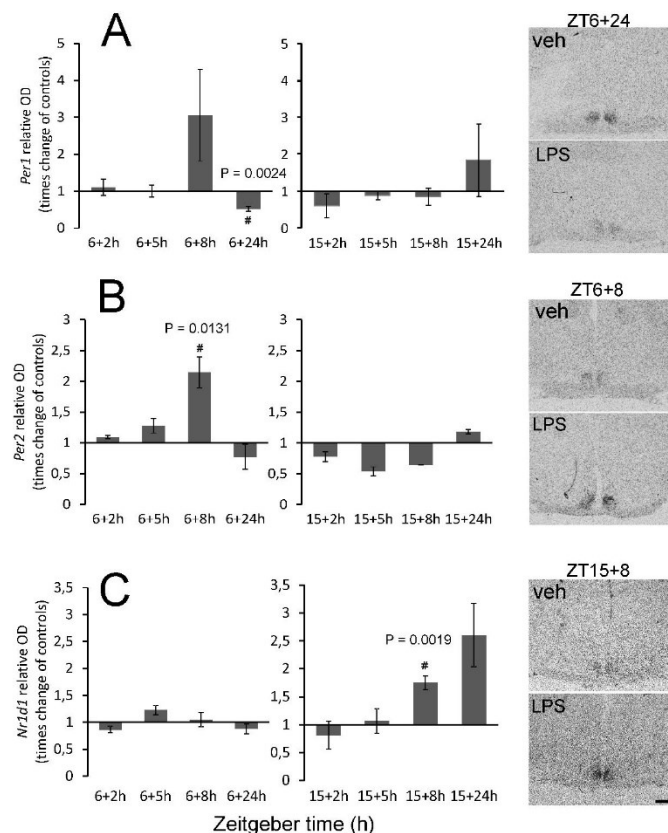


Fig 4. Effect of acute systemic LPS administration on clock gene expression in rat SCN. Adult rats were injected with LPS (1 mg/kg) either during the day, at ZT6, or at night, at ZT15, and sampled 2 h, 5 h, 8 h and 24 h later. The levels of *Per1* (A), *Per2* (B) and *Nr1d1* (C) mRNAs were assessed as the intensity of the hybridisation signal. Each column represents the mean of four values \pm SEM. # P: Values of multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni post-hoc test. The representative photomicrographs of coronal sections of the SCN demonstrate the intensity of the signals for each control/LPS pair that showed statistically significant differences. Scale bar = 500 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405.g004>

dmSCN within 2 h ($P = 0.0175$) (Fig 5B). LPS applied at ZT15 significantly reduced the number of pERK1/2 immunopositive cells in the vlSCN within 8 h ($P = 0.0209$) (Fig 5A). There was no significant change in pERK1/2 levels in the dmSCN at night.

LPS applied at ZT6 did not significantly induce pGSK3 β increase in the SCN at any time point, although on average, the level of pGSK3 β in all LPS-treated sections was 1.4648 (± 0.1691) higher than the level in control sections (Fig 5D and 5E). LPS applied at ZT15 significantly reduced the number of pGSK3 β immunopositive cells in the vlSCN within 8 h ($P = 0.0073$) (Fig 5D). There was no significant change in pGSK3 β levels in dmSCN at night (Fig 5E).

Discussion

Several reports have focused on the effect of systemic inflammation on various aspects of the circadian physiology [12, 16, 19–22, 33–35]. Most of these studies, however, only used one

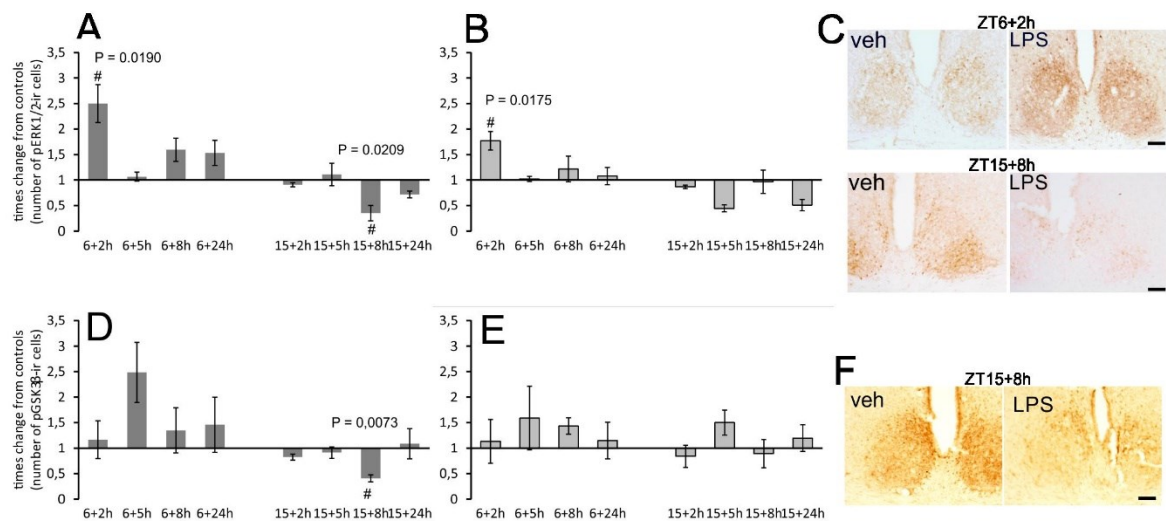


Fig 5. Effect of acute systemic LPS administration on ERK1/2 (A, B) and GSK3 β (D, E) phosphorylation within rat SCN. Adult rats were injected with LPS (1 mg/kg) either during the day at ZT6 or at night at ZT15 and sampled 2 h, 5 h, 8 h and 24 h later. Levels of immunopositive cells were assessed separately for the ventrolateral (A, D) and dorsomedial (B, E) SCN. Each column represents the mean of four values \pm SEM. # P: Values of multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni post-hoc test. The representative photomicrographs of coronal sections of the SCN demonstrate the intensity and distribution of pERK1/2 (C) and pGSK3 β (F) in the control and LPS-treated animals when the control/LPS pairs showed statistically significant differences. Scale bar = 200 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199405.g005>

daytime period for inflammatory stimulation, although it is well understood that the susceptibility of organisms to inflammatory stimuli is affected by the circadian clock. Previously, we have shown that LPS applied either during the day or at night affects the phosphorylation of STAT3 in the SCN differently [24]. In this study, we followed the changes in the *Stat3* mRNA and several selected markers that are known for their sensitivity to extra-clock events and may serve as probes to the main oscillatory loops and posttranslational events. The daytime point of infection coincides with high levels of STAT3 protein and of clock genes *Per1*, *Per2* and *Nr1d1* mRNAs [1, 24, 36, 37], and was chosen to deduce a possible LPS-induced decrease of their levels. The night point coincides with low levels of selected gene transcripts, which allows for measuring a possible induction in response to LPS. We used 1 mg/kg of LPS, which has been shown to suppress the expression of *Per1* gene in the SCN the day following the injection at ZT1 [35] and to induce the phosphorylation of STAT3 in the SCN astrocytes [24].

The behavioural effect of the 1 mg/kg LPS dose was controlled using locomotor activity monitoring. The maximal reduction of locomotion was observed the first day after the LPS treatment, as expected, but the gradual recovery process proceeded faster when the animals were infected during the day compared with at night. Total activity counts and the amplitude of the behavioural rhythm seemed to return to their original state faster after the daytime LPS injection. Considering the locomotor activity measurement as one of the markers of sickness behaviour, which typically occurs after infection [38], our observation suggests that the sickness behaviour after the LPS treatment can be improved more quickly if animals are infected during the day. This corresponded well to the organism's reduced reaction to a parasitic infection when the organism was infected during the day compared to at night [10]. It has been demonstrated that LPS administration at ZT14 triggers higher plasma level of cytokines IL-6 and TNF- α as compared with administration at ZT2, which has been associated with daily

changes in SCN activity [12]. It may, therefore, be possible that higher levels of inflammatory cytokines at night decelerate the amelioration of sickness or worsen the symptoms.

STAT3 plays various roles in many cell types, but it is best known as a regulator of the inflammatory response and of cancer growth [23, 39]. In the brain, STAT3 plays a significant role in astrocyte reactivity in response to pathological conditions in the nervous tissue [40]. Our data showed that LPS administration at ZT15 induced about 10 times higher *Stat3* mRNA levels than at ZT6. At ZT6, the *Stat3* mRNA induction is suggested by *in situ* hybridization, but significant only in RT-PCR experiment. This may reflect higher sensitivity of the RT-PCR that may be more suitable for distinguishing the subtle differences. There was also a significant difference in mRNA levels between day and night among the control animals, so we performed *in situ* hybridisation to detect the circadian profile of *Stat3* expression in the SCN. The data showed that spontaneous *Stat3* expression in the SCN was high during the day and low during the night. It is possible that LPS-induced upregulation may be limited by “ceiling” effect of the *Stat3* transcription which cannot be exceeded after the daytime injection. Yet, in average 15 times upregulation of *Stat3* mRNA above the baseline level at the time, when the STAT3 is not usually incorporated into the SCN signalling cascades, could serve as the specific time signal that may affect the production of cytokines and inflammatory response within the circadian clock.

It has been shown that STAT3 in the SCN is expressed exclusively in astrocytes [24]. We can, therefore, assume that the rhythmic expression of its mRNA and transcriptional upregulation by the LPS also occur in astrocytes. Growing evidence supports the role of astrocytes in mediating the immune signals to the SCN [21, 22, 24, 33]. The chemokine Ccl2, which is secreted in response to immune activation by SCN astrocytes *in vitro* [21], has recently been shown to play a role in the circadian response to immune activation [22]. Moreover, the treatment of SCN astrocytes isolated *in vitro* with TNF- α modulates the clock genes expression of SCN astrocytes [16, 21]. STAT3 can be part of the signalling by which the SCN astrocytes communicate the pathological conditions to the circadian clock. We found previously that the SCN astrocytes generate the circadian rhythm in ATP release and that ATP application modulates the synaptic activity of SCN neurons [41, 42]. The ATP production was strongly reduced in the astrocytes with deletion of STAT3 signalling [43]. Hypothetically, the LPS-induced changes in STAT3 activity in the SCN astrocytes may affect the SCN neuronal network and affect the neuronal clockwork. Interestingly, STAT3 has also been implicated in the regulation of sickness behaviour, including adipsia and febrile response to the LPS [44], which may support the significance of STAT3 signalling in the immune response of the hypothalamus.

Regulation of *Per* genes expression is the principal mechanism by which photic or nonphotic stimuli adjust the circadian phase to the external time [36, 45]. Several studies have reported decreases in *Per1* and *Per2* levels in response to various nonphotic stimuli when applied during the day [46–48]. The first study concerning the effect of systemic LPS on *Per* gene expression in the SCN did not report any changes in either *Per* gene after 50 μ g/kg of LPS was administered at ZT22, i.e. at the late night [49], which is similar to our observations after LPS at ZT15, i.e., at the early night. On the other hand, a 24-h treatment with the cytokine TNF- α suppressed the transcription of *Per1* and *Per2* in mice fibroblasts and livers [50], but the short-term stimulation led to upregulation of *Per1* and *Per2* in fibroblast culture [51]. Accordingly, we revealed a mild increase of *Per2* after 8 h and a decrease of *Per1* 24 h after the LPS was injected at ZT6 but not at ZT15. In the SCN, the prolonged 24-h responsiveness to daytime LPS application, as observed for *Per1* expression, has been reported before; under similar experimental conditions, upregulation of the p65 subunit of NF- κ B transcription complex and immediate early gene *c-Fos* in the SCN was observed only 24 h after the LPS treatment [18]. The suppression of clock gene expression in the SCN also occurred within the next circadian

cycle after LPS administration [35]. Furthermore, in our previous study, we observed a high level of phosphorylated STAT3 on Tyr705 after 24 h of LPS treatment during the daytime [24]. Our findings on how LPS affected *Per* genes expression thus do not contradict previous observations and stress the significance of the 8-h and 24-h delays of the circadian clock's responsiveness to inflammatory daytime stimulation.

The effect of LPS on *Nr1d1* expression in the SCN has not yet been studied. The significance of the protein product of this gene—nuclear receptor REV-ERB α —was demonstrated in macrophages, where REV-ERB α negatively regulates the inflammatory function by repressing IL-6 and chemokine Ccl2 gene induction following an LPS challenge [52, 53]. Whether the upregulation of *Nr1d1* expression 8 h after the LPS injection affects the levels of IL-6 or Ccl2 in the SCN can be speculated upon. The Ccl2 in the SCN shows the circadian rhythm, with a high level during the night. The Ccl2 level already decreases by ZT23, the time of *Nr1d1* upregulation after early-night LPS injection [22]. Considering that Ccl2 can be induced within 1 h after the LPS treatment, the delayed upregulation of REV-ERB α may enforce the clock-driven suppression of the Ccl2. A similar mechanism has been proposed for the role of REV-ERB α in macrophages [11].

The pERK1/2 level in the SCN is rhythmic and oscillates in antiphase between vlSCN and dmSCN [25]. Its level in the vlSCN can be induced within minutes by the light pulses at night [8]. Our data showed pERK1/2 upregulation within 2 h after LPS treatment at ZT6 in both parts of the SCN, and downregulation of its high level in the vlSCN 8 h after the LPS injection at ZT15. Besides the well-documented LPS-induced pERK1/2 level in macrophages and *in vitro* osteoblasts [54–56], the dramatic increase in pERK1/2 immunoreactivity was also apparent 2 h after LPS was administered in the paraventricular nucleus of the hypothalamus [57]. Two studies observed the reduction of a spontaneously high pERK1/2 level in the vlSCN at night: it declined within 2 h after light pulses at night [58] and after an opioid challenge at night [25].

Similarly to pERK1/2, the high level of pGSK3 β in the vlSCN was reduced 8 h after LPS was administered at night. GSK3 β promotes the nuclear translocation of clock protein PER2 [3] and triggers the proteasomal degradation of CRY2 [4]. It has been demonstrated that GSK3 β promotes the LPS-induced production of proinflammatory cytokines in the microglial cells, possibly in cooperation with STAT3 [27, 59]. It may be important to reiterate that GSK3 β kinase is active in its dephosphorylated state. It is, therefore, possible that a short-term increase in its activity contributes to LPS-induced changes in cytokine level at night. In the circadian pacemaker, the transient GSK3 β -induced increase of phosphorylation of clock proteins could change the dynamics of the clockwork mechanism and thus participate in maintaining a steady-state clock status.

The induction and reduction of the clock genes and pERK1/2 with the pGSK3 β levels in the SCN in our study seemed to be relatively mild. Although significant, the induction does not vary by order, such as after the light stimulus, for example. A majority of the studies concerning the effect of LPS or cytokines on the SCN markers have shown similar magnitudes [18, 20, 24]. Because different doses of LPS and cytokines were used in these studies, the magnitude of the observed changes does not seem to depend on the intensity or specificity of the inflammatory stimuli. These alterations could reflect the hypothalamic homeostatic drive, which helps the circadian clock to cope with the acute pathological environment. We observed the quick response of *Stat3* and pERK1/2, which reacted within two hours, and—together with other authors—the delayed response of *Per1* gene after the daytime stimulus. The most active period of LPS-induced changes in SCN state seemed to occur about 8 hours after the infection; at this time, the *Per2* was induced after the daytime LPS injection, compared to *Nr1d1* after the nighttime LPS injection. Regarding the clockwork machinery, both effects should result in phase

shifts of the circadian oscillations. In addition, the increase of active GSK3 β may lead to advances of the clock phase [60]. It is possible that the mild processes within the circadian clockwork help to balance the possible dysregulation of the circadian clock output.

Conclusions

The present study shows that the time of LPS administration affects the recovery rate of locomotor activity rhythm and induces the transient changes in clock gene expression and the levels of pERK1/2 and pGSK3 β in the rat SCN that may be a part of the steady-state function of the clock in mild pathological conditions. We also provide the first report on the circadian rhythmicity of *Stat3* gene expression in the SCN, and we demonstrate that the LPS administration induces not only phosphorylation of STAT3 that has been shown previously, but also its transcription and regulate thus significantly *Stat3* mRNA level in the SCN.

Supporting information

S1 Fig. Effect of acute systemic LPS administration on clock gene expression in rat SCN.

Adult rats were injected with LPS (1 mg/kg) either during the day, at ZT6, or at night, at ZT15, and sampled 2 h, 5 h, 8 h and 24 h later. The levels of *Per1* (A), *Per2* (B) and *Nr1d1* (C) mRNAs were assessed as the intensity of the hybridisation signal. Each column represents the mean of four values \pm SEM. # P: Values of multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni post-hoc test. (DOCX)

S2 Fig. Effect of acute systemic LPS administration on pERK1/2 (A, B) and pGSK3 β (C, D) phosphorylation within rat SCN. Adult rats were injected with LPS (1 mg/kg) either during the day, at ZT6, or at night, at ZT15, and sampled 2 h, 5 h, 8 h and 24 h later (grey columns) (controls; black columns). Levels of pERK1/2 (A, B) and pGSK3 β (C, D) were assessed separately for the ventrolateral (A, C) and dorsomedial (B, D) SCN. Each column represents the mean of four values \pm SEM. # P: Value of multiple t-tests with the Sidak-Bonferroni post-hoc test. (DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Peter Ergang for his help with the laser dissection.

Author Contributions

Conceptualization: Jiří Novotný, Zdenka Bendová.

Data curation: Simona Moravcová, Barbora Melkes, Hana Kyclerová, Veronika Spišská.

Formal analysis: Simona Moravcová, Barbora Melkes.

Funding acquisition: Zdenka Bendová.

Investigation: Simona Moravcová, Dominika Pačesová, Hana Kyclerová, Veronika Spišská.

Methodology: Dominika Pačesová, Hana Kyclerová, Veronika Spišská.

Supervision: Jiří Novotný, Zdenka Bendová.

Writing – original draft: Zdenka Bendová.

Writing – review & editing: Simona Moravcová, Dominika Pačesová, Veronika Spišská, Jiří Novotný.

References

1. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 2012; 74: 246–260. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.006> PMID: 22542179
2. Morin LP. SCN organization reconsidered. *J Biol Rhythms* 2007; 22: 3–13. <https://doi.org/10.1177/0748730406296749> PMID: 17229920
3. Iitaka C, Miyazaki K, Akaide T, Ishida N. A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*. 2005; 280: 29397–29402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503526200> PMID: 15972822
4. Kurabayashi N, Hirota T, Harada Y, Sakai M, Fukada Y. Phosphorylation of mCRY2 at Ser557 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the mouse. *Chronobiol Int*. 2006; 23: 129–134. <https://doi.org/10.1080/07420520500464478> PMID: 16687286
5. Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T, Fukada Y. Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells*. 2004; 9: 697–708. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00758.x> PMID: 15298678
6. Sanada K, Okano T, Fukada Y. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem*. 2002; 277: 267–271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107850200> PMID: 11687575
7. Reischl S, Kramer A. Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. *FEBS Lett*. 2011; 585: 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.038> PMID: 21376720
8. Obrietan K, Impey S, Storm DR. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat. Neurosci*. 1998; 1: 693–700. <https://doi.org/10.1038/3695> PMID: 10196585
9. Dziema H, Oatis B, Butcher GQ, Yates R, Hoyt KR, Obrietan K. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 1617–1627. PMID: 12752379
10. Kiessling S, Dubeau-Laramée G, Ohm H, Labrecque N, Olivier M, Cermakian N. The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Sci Rep*. 2017; 7: 10892. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11297-8> PMID: 28883509
11. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, et al. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 582–587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106750109> PMID: 22184247
12. Guerrero-Vargas NN, Salgado-Delgado R, Basualdo Mdel C, García J, Guzmán-Ruiz M, Carrero JC, et al. Reciprocal interaction between the suprachiasmatic nucleus and the immune system tunes down the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*. 2014; 273: 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.05.012> PMID: 24916044
13. Kalsbeek A, Liu J, Lei J, Timmermans L, Foppen E, Cailotto C, et al. Differential involvement of the suprachiasmatic nucleus in lipopolysaccharide-induced plasma glucose and corticosterone responses. *Chronobiol Int*. 2012; 29: 835–849. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.699123> PMID: 22823867
14. Wachulec M, Li H, Tanaka H, Peloso E, Satinoff E. Suprachiasmatic nuclei lesions do not eliminate homeostatic thermoregulatory responses in rats. *J Biol Rhythms*. 1997; 12: 226–234. <https://doi.org/10.1177/074873049701200304> PMID: 9181434
15. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol*. 2010; 185: 5796–5805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001026> PMID: 20944004
16. Marpegán L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA. Circadian responses to endotoxin treatment in mice. *J Neuroimmunol*. 2005; 160: 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.11.003> PMID: 15710463
17. Sadki A, Bentivoglio M, Kristensson K, Nygård M. Suppressors, receptors and effects of cytokines on the aging mouse biological clock. *Neurobiol Aging*. 2007; 28: 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.12.007> PMID: 16426706
18. Beynon AL, Coogan AN. Diurnal, age, and immune regulation of interleukin-1 β and interleukin-1 type 1 receptor in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*. 2010; 27: 1546–1563. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.501927> PMID: 20854134
19. Paladino N, Leone MJ, Plano SA, Golombek DA. Paying the circadian toll: the circadian response to LPS injection is dependent on the Toll-like receptor 4. *J Neuroimmunol*. 2010; 225: 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.015> PMID: 20554031
20. Paladino N, Mul Fede ML, Duhart JM, Marpegán L, Golombek DA. Modulation of mammalian circadian rhythms by tumor necrosis factor- α . *Chronobiol Int*. 2014; 31: 668–769.

21. Duhart JM, Leone MJ, Paladino N, Evans JA, Castanon-Cervantes O, Davidson AJ, et al. Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- α . *J Immunol*. 2013; 191: 4656–4664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300450> PMID: 24062487
22. Duhart JM, Brocardo L, Mul Fedele ML, Guglielmotti A, Golombek DA. CCL2 mediates the circadian response to low dose endotoxin. *Neuropharmacology*. 2016; 108: 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.005> PMID: 27178133
23. Rummel C. Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun*. 2016; 54: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.003> PMID: 26348582
24. Moravcová S, Červená K, Pačesová D, Bendová Z. Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the Day/Night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res*. 2016; 94: 99–108. <https://doi.org/10.1002/jnr.23673> PMID: 26420542
25. Pačesová D, Volfová B, Červená K, Hejnová L, Novotný J, Bendová Z. Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol*. 2015; 172: 3638–3649. <https://doi.org/10.1111/bph.13152> PMID: 25828914
26. Beurel E, Jope RS. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 2008; 283: 21934–21944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802481200> PMID: 18550525
27. Beurel E, Jope RS. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J Neuroinflammation*. 2009; 6: 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-9> PMID: 19284588
28. Soták M, Polidarová L, Musílková J, Hock M, Sumová A, Pácha J. Circadian regulation of electrolyte absorption in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 301: G1066–G1074. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00256.2011> PMID: 21903759
29. Hahnová K., Pačesová D., Volfová B., Červená K., Kašparová D., Žurmanová J., et al. Circadian Dex-ras1 in rats: Development, location and responsiveness to light. *Chronobiol Int*. 2016; 33: 141–150. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1120741> PMID: 26785766
30. Bendová Z, Sládek M, Svobodová I. The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. *Neurochem Int*. 2012; 61: 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.04.016> PMID: 22543102
31. Matějů K, Bendová Z, El-Hennamy R, Sládek M, Sosniyenko S, Sumová A. Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2009; 29: 490–501. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06609.x> PMID: 19222559
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609
33. Leone MJ, Marpegan L, Bekinschtein TA, Costas MA, Golombek DA. Suprachiasmatic astrocytes as an interface for immune-circadian signalling. *J Neurosci Res*. 2006; 84: 1521–1527. <https://doi.org/10.1002/jnr.21042> PMID: 16955486
34. Leone MJ, Marpegan L, Duhart JM, Golombek DA. Role of proinflammatory cytokines on lipopolysaccharide-induced phase shifts in locomotor activity circadian rhythm. *Chronobiol Int*. 2012; 29: 715–723. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.682681> PMID: 22734572
35. Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, et al. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *J Surg Res*. 2008; 145: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.01.010> PMID: 18279697
36. Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*. 1997; 9: 1055–1064.
37. Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*. 1997; 19: 1261–1269. PMID: 9427249
38. Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev*. 1988; 12: 123–137. PMID: 3050629
39. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14: 736–746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818> PMID: 25342631

40. Ceyzériat K, Abjean L, Carrillo-de Sauvage MA, Ben Haim L, Escartin C. The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience*. 2016; 330: 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043> PMID: 27241943
41. Bhattacharya A, Vavra V, Svobodova I, Bendova Z, Vereb G, Zemkova H. Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*. 2013; 33: 8035–8044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4682-12.2013> PMID: 23637193
42. Svobodova I, Bhattacharya A, Ivetic M, Bendova Z, Zemkova H. Circadian ATP Release in Organotypic Cultures of the Rat Suprachiasmatic Nucleus Is Dependent on P2X7 and P2Y Receptors. *Front Pharmacol*. 2018; 6:192.
43. Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, et al. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One*. 2010; 5: e9532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009532> PMID: 20224768
44. Damm J, Harden LM, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behaviour, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain. *Neuropharmacology*. 2013; 71: 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.014> PMID: 23548702
45. Akiyama M, Kouzu Y, Takahashi S, Wakamatsu H, Moriya T, Maetani M, et al. Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci*. 1999; 19: 1115–1121. PMID: 9920673
46. Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings MH. Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 15211–15216. PMID: 10611364
47. Horikawa K, Yokota S, Fujii K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, et al. Nonphotic entrainment by 5-HT1A/7 receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*. 2000; 20: 5867–5873. PMID: 10908630
48. Fukuhara C, Brewer JM, Dirden JC, Bittman EL, Tosini G, Harrington ME. Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 2001; 314: 119–122. PMID: 11704298
49. Takahashi S, Yokota S, Hara R, Kobayashi T, Akiyama M, Moriya T, et al. Physical and inflammatory stressors elevate circadian clock gene mPer1 mRNA levels in the paraventricular nucleus of the mouse. *Endocrinology*. 2001; 142: 4910–4917. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8487> PMID: 11606459
50. Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, Jud C, Tobler I, Birchler T, et al. TNF- α suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104: 12843–12848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701466104> PMID: 17646651
51. Petrzilka S, Taraborrelli C, Cavadini G, Fontana A, Birchler T. Clock gene modulation by TNF- α depends on calcium and p38 MAP kinase signaling. *J Biol Rhythms*. 2009; 24: 283–294. <https://doi.org/10.1177/0748730409336579> PMID: 19625730
52. Sato S, Sakura T, Ogasawara J, Shirato K, Ishibashi Y, Oh-ishi S, et al. Direct and indirect suppression of interleukin-6 gene expression in murine macrophages by nuclear orphan receptor REV-ERB α . *Scientific World Journal*. 2014a; 685854. <https://doi.org/10.1155/2014/685854> PMID: 25401152
53. Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, et al. A circadian clock gene, Rev-erb α , modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *J Immunol*. 2014b; 192: 407–417. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301982> PMID: 24307731
54. Rawadi G, Ramez V, Lemerrier B, Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins in murine macrophages: involvement in cytokine synthesis. *J Immunol*. 1998; 160: 1330–1339. PMID: 9570551
55. Chen CC, Wang JK. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. *Mol Pharmacol*. 1999; 55: 481–488. PMID: 10051531
56. Daigang L, Jining Q, Jinlai L, Pengfei W, Chuan S, Liangku H, et al. LPS-stimulated inflammation inhibits BMP-9-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between BMP/MAPK and Smad signaling. *Exp Cell Res*. 2016; 341: 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.009> PMID: 26794904
57. Singru PS, Sánchez E, Acharya R, Fekete C, Lechan R.M. Mitogen-activated protein kinase contributes to lipopolysaccharide-induced activation of corticotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 2008; 149: 2283–2292. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1478> PMID: 18187539
58. Červená K, Pačesová D, Spišská V, Bendová Z. Delayed Effect of the Light Pulse on Phosphorylated ERK1/2 and GSK3 β Kinases in the Ventrolateral Suprachiasmatic Nucleus of Rat. *J Mol Neurosci*. 2015; 56: 371–376. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0563-0> PMID: 25894767

59. Green HF, Nolan YM. GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia. *Neurochem Int.* 2012; 61: 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.07.003> PMID: 22796213
60. Osland TM, Fernø J, Håvik B, Heuch I, Ruoff P, Lærum OD et al. Lithium differentially affects clock gene expression in serum-shocked NIH-3T3 cells. *J Psychopharmacol.* 2011; 25: 924–33. <https://doi.org/10.1177/02698811110379508> PMID: 20837565